

Funktionalisierte Oligonukleotide – Fluoreszenzsonden, Metallkomplex- Konjugate und Ladungstransfer

Zur Erlangung des
DOKTORGRADES DER NATURWISSENSCHAFTEN
(Dr. rer. Nat.)

der Naturwissenschaftlichen Fakultät IV – Chemie und Pharmazie
der Universität Regensburg



DISSERTATION

von
Diplom-Chemiker
Thomas Ehrenschwender
aus Bogen

Regensburg, 2011

Diese Arbeit wurde angeleitet von Prof. Dr. Hans-Achim Wagenknecht

Prüfungsgesuch eingereicht am: 9. Mai 2011

Tag der mündlichen Prüfung: 10. Juni 2011

Prüfungsausschuss: Prof. Dr. Jörg Daub (Vorsitzender)
Prof. Dr. Hans-Achim Wagenknecht
Prof. Dr. Oliver Reiser
Prof. Dr. Joachim Wegener

Meiner Familie

*Forschung passiert einfach,
es ist wie eine Fahrt ins Blaue.*

Dieter Seebach

Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von Januar 2008 bis Mai 2011 am Institut für Organische Chemie der Universität Regensburg unter Anleitung durch Herrn Prof. Dr. Hans-Achim Wagenknecht angefertigt.

Mein besonderer Dank gilt meinem Doktorvater Prof. Dr. Hans-Achim Wagenknecht für die hervorragende Betreuung und Unterstützung, sowie für die umfangreiche wissenschaftliche Freiheit und die sehr gute Arbeitsatmosphäre.

Im Speziellen möchte ich mich bedanken bei:

- Meinen Kollegen Dr. Janez Barbaric, Sebastian Barrois, Effi Bätzner, Daniela Baumstark, Dr. Sina Berndl, Dr. Christoph Beyer, Nadine Herzig, Carolin Holzhauser, Daniel Lachmann, Michaela Lutz, Dr. Florian Menacher, Alexander Penner, Dr. Christa Prunkl, Moritz Rubner, Wolfgang Schmucker, Sabrina Sezi, Claudia Stubinitzky, Dr. Linda Valis, Dr. Reji Varghese, Dr. Clemens Wagner, Dr. Claudia Wanninger-Weiß, Michael Weinberger, Christian Wellner und Ulrike Wenge für die gute Zusammenarbeit und die schönen vier Jahre im AK Wagenknecht.
- Meinen Laborkollegen Nadine, Schrotti, Christa, Claudia und Moritz für die herzliche und fröhliche Laboratmosphäre.
- Frau Weck für ihre stetige Hilfsbereitschaft und Unterstützung in organisatorischen und verwaltungstechnischen Belangen.
- Dr. Thomas Burgemeister und seinen Mitarbeitern der NMR-Abteilung der Universität Regensburg für die zuverlässige Messung meiner Proben.
- Josef Kiermeier und Wolfgang Söllner aus der Zentralen Analytik der Universität Regensburg für die Anfertigung der Massenspektren.

- Anna Barth aus dem Arbeitskreis von Prof. Puchta am KIT für die Durchführung der Gelelektrophorese-Experimente
- Den Mitarbeitern der Arbeitsgruppe von Prof. Yersin für die Hilfe bei der Bestimmung der Quantenausbeuten
- Prof. Dr. Thorsten Fiebig und seinen Mitarbeitern für die Durchführung der zeitaufgelösten Transientenabsorptionsmessungen
- Dr. Péter Kele und seinen Mitarbeitern für die gute Zusammenarbeit und die Bereitstellung der Azide der „Mega-Stokes“-Farbstoffe
- Allen anderen, die mir bei der Durchführung meiner Arbeit mit Rat und Tat zur Seite gestanden haben und hier nicht persönlich erwähnt werden

Mein ganz besonderer Dank gilt meinen Eltern, ohne deren Unterstützung mein Studium und diese Arbeit nicht möglich gewesen wären.

Inhaltsverzeichnis

1	Motivation	1
2	Themenstellung	3
3	Theoretischer Hintergrund	8
3.1	Fluoreszenzspektroskopie	8
3.2	Anknüpfungsmethoden für Sonden an Oligonukleotide	14
3.2.1	Einbau von Sonden während der Festphasensynthese	14
3.2.2	Postsynthetische Modifikation von Oligonukleotiden	16
3.3	Photoinduzierter Ladungstransfer in DNA	20
3.3.1	Mechanismus des Ladungstrfers durch DNA	22
3.3.2	Einflußgrößen auf den Ladungstransport in DNA	26
3.3.3	Untersuchungen zum photoinduzierten Ladungstransfer	32
4	Neue Fluoreszenzsonden für die DNA-Analytik	42
4.1	Langwellig emittierende Fluoreszenzsonden mit großen Stokes- Verschiebungen	43
4.1.1	Hintergrund und Synthese	43
4.1.2	Untersuchung der Eigenschaften einzelner Sonden in DNA	46
4.1.3	Untersuchungen zum FRET	51
4.2	Bodipy-Fluoreszenzsonden mit großer Helligkeit	58
4.2.1	Hintergrund zu Bodipy-Derivaten in der Bio-Analytik	58
4.2.2	Synthese und optische Eigenschaften des Bodipy-Basensurrogates .	59
4.2.3	Untersuchung Bo-modifizierter Oligonukleotide	61
4.2.4	Einfluss der Konformation des acyclischen Linkers	66
4.2.5	Vergleich zwischen Bo- und BodU-modifizierten Oligonukleotiden	67
4.2.6	Vergleich zwischen Bodipy- und Fluorescein-markierten Oligonukleotiden	69
4.3	Synthese neuer 2'-OH modifizierter Nukleoside für die postsynthetische DNA-Funktionalisierung	71
4.4	Zusammenfassung der Ergebnisse	74

5	Metallkomplex / DNA – Konjugate mit Hydroxychinolin- und Terpyridin-Liganden	76
5.1	Metallkomplex / DNA – Konjugate.....	76
5.2	Hydroxychinolinvermittelte DNA-Basenpaare	80
5.3	Verknüpfung von DNA-Strängen durch terpyridinmodifizierte Uridine.....	86
5.3.1	Synthese des Terpyridin-dU Bausteins	89
5.3.2	Terpyridinmodifizierte Oligonukleotide	90
5.3.3	Verknüpfung von Oligonukleotiden über Terpyridin-Komplexe	95
5.3.4	Zusammenfassung der Ergebnisse.....	110
6	DIMAPdU als nukleosidischer Elektronendonator.....	111
6.1	Pyrenmodifizierte Nukleoside als fluoreszente Sonden für Ladungstransferreaktionen.....	111
6.2	Synthese von 5-(6- <i>N,N</i> -Dimethylamino-2-pyrenyl)-2'-deoxyuridin (DIMAPdU).....	115
6.3	Spektroskopische und elektrochemische Charakterisierung von DIMAP und DIMAPdU	117
6.4	Untersuchung von DIMAPdU-modifizierten Oligonukleotiden	125
6.5	Ladungstransferexperimente mit DIMAPdU als nukleosidischem Elektronendonor / Lochakzeptor	130
6.5.1	Oxidativer Lochtransfer zwischen Nilrot und DIMAPdU	132
6.5.2	Elektronentransfer zwischen DIMAPdU und <i>N</i> -Phenylsulfonylindol..	139
6.5.3	Ladungstransferexperimente zwischen DIMAPdU und DAP ²⁺	145
6.6	Zusammenfassung der Ergebnisse.....	154
7	Metallkomplex vermittelte Ladungstransferreaktionen	157
8	Zusammenfassung.....	167
9	Experimenteller Teil	173
9.1	Verbrauchsmaterialien und Geräte.....	173
9.2	Synthesen	178
9.2.1	Darstellung des alkynylmodifizierten Uridins 6	178

9.2.2	Darstellung des Bodipy-Basensurrogates	179
9.2.3	Darstellung der 2'OH-modifizierten Cytidine 19, 20 und 21	183
9.2.4	Darstellung des Hydroxychinolin-Basensurrogates	194
9.2.5	Darstellung des terpyridinmodifizierten Uridin-Bausteins	200
9.2.6	Darstellung des Dimethylaminopyren-modifizierten Uridins	202
9.3	Synthese und Charakterisierung von Oligonukleotiden	207
9.3.1	Verwendete Oligonukleotidsequenzen	207
9.3.2	Kupplungsprotokolle	213
9.3.3	Aufarbeitung und Reinigung der Oligonukleotide	215
9.3.4	Klickreaktion	217
9.3.5	Aufarbeitung der HQ-Oligonukleotide	217
9.3.6	Charakterisierung der Hybridisierung der Oligonukleotide	218
9.4	Untersuchungen an mit Hydroxychinolin oder Terpyridin modifizierten Oligonukleotiden	219
10	Literaturverzeichnis	221

Abkürzungsverzeichnis

2D	zweidimensional
1PydU	5-(1-Pyrenyl)-2'-desoxyuridin
2PydU	5-(2-Pyrenyl)-2'-desoxyuridin
Å	Angström
A	Adenin, 2'-Desoxyadenosin
Abb.	Abbildung
abs.	absolut
Ak	Akzeptor
B	Helligkeit (<i>brigtness</i>)
br s	breites Singulett
bzgl.	bezüglich
bzw.	beziehungsweise
C	Cytosin, 2'-Desoxycytidin
ca.	circa
CDI	1,1'-Carbonyldiimidazol
CI	chemische Ionisation
COD	1,5-Cyclooctadien
COSY	<i>correlation spectroscopy</i>
CPD	Cyclobutan-Pyrimidin-Dimer
CPG	<i>Controlled Pore Glass</i>
CT	Ladungstransfer (<i>charge transfer</i>)
CV	Cyclovoltammetrie
δ	chemische Verschiebung
d	Dublett, Tag
DAP ²⁺	Dialkyldiazapyrenium-Derivat
DC	Dünnschicht-Chromatographie
DCM	Dichlormethan
d. h.	das heißt
DIMAP	1-(<i>N,N</i> -Dimethylamino)-pyren
DIMAPdU	5-(6- <i>N,N</i> -Dimethylamino-2-pyrenyl)-2'-deoxyuridin
DIPEA	Diisopropylethylamin

Abkürzungsverzeichnis

DMF	Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DMT	4,4'-Dimethoxytrityl
DNA	Desoxyribonucleinsäure
Do	Donor
dppf	1,1'-Bis(diphenylphosphino)Ferrocen
ds	doppelsträngig (<i>double stranded</i>)
dtbpy	4,4'-Di(<i>tert</i> -butyl)-2,2'-bipyridyl
d. Th.	der Theorie
dU	2'-Desoxyuridin
E_{00}	Singulett-Energie des HOMO-LUMO-Übergangs
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EET	Überschlusselektronen-Transfer (<i>excess electron transfer</i>)
EI	elektrische Ionisation
em	Emission
E_{ox}	Oxidationspotential
E_{ox}^*	Oxidationspotential des angeregten Zustands
eq.	Äquivalent
E_{red}	Reduktionspotential
E_{red}^*	Reduktionspotential des angeregten Zustands
ESI	Elektrosprayionisation
EPR	Elektronenparamagnetische Resonanz
ESR	Elektronenspinresonanz
ET	Elektronentransfer
EET	Elektronentransfer (<i>excess electron transfer</i>)
EtOH	Ethanol
eV	Elektronenvolt
exc	Anregung (<i>excitation</i>)
Φ	Quantenausbeute
FAB	<i>fast atom bombardment</i>
FC	<i>Flash</i> -Säulenchromatographie
FRET	Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer
Fq	<i>fraction quenched</i>

fs	Femtosekunde
G	Guanin, 2'-Desoxyguanosin
G ^{ox}	Oxidationsprodukte von G
h	Stunde
HOMO	<i>highest occupied molecular orbital</i>
HPLC	<i>high performance liquid chromatography</i>
HQ	Hydroxychinolin (<i>Hydroxyquinoline</i>)
HT	Lochtransfer (<i>hole transfer</i>)
HV	Hochvakuum
Hz	Hertz
IC	<i>Internal conversion</i>
ISC	<i>Intersystem Crossing</i>
<i>J</i>	Kopplungskonstante
K	Kelvin
λ	Wellenlänge
LC	<i>ligand centered</i>
LUMO	<i>lowest unoccupied molecular orbital</i>
M	molar, mol/L
m	Multipllett
mbar	Millibar
m/z	Verhältnis Masse zu Ladung
MeCN	Acetonitril
MeOH	Methanol
MHz	Megahertz
min.	Minute
mL	Milliliter
μ L	Mikroliter
MLCT	<i>metal to ligand charge tranfer</i>
mM	millimolar
μ M	mikromolar
MS	Massenspektrometrie
Na-P _i	Natriumphosphatpuffer
n. d.	nicht bestimmt (<i>not determined</i>)

Abkürzungsverzeichnis

nm	Nanometer
NMR	Kernspinmagnetresonanz (<i>Nuclear Magnetic Resonance</i>)
NHE	Normalwasserstoff-Elektrode
NR	Nilrot
ns	Nanosekunde
OD	optische Dichte
ppm	<i>parts per million</i>
ps	Pikosekunde
Py	Pyren(yl)
RP	<i>Reversed Phase</i>
RT	Raumtemperatur
s	Singulett, Sekunde
SCE	<i>Saturated Calomel Electrode</i>
sog.	sogenannt
ss	einzelsträngig (<i>single stranded</i>)
T	Thymin, 2'-Desoxythymidin
t	Triplett
TBAF	Tetrabutylammonium Fluorid
TBAHFP	Tetrabutylammoniumhexafluorophosphat
TBTA	Tris[(1-benzyl-1H-1,2,3-triazol-4-yl)methyl]amin
THF	Tetrahydrofuran
T _m	Schmelztemperatur
TMS	Trimethylsilyl
tpy	Terpyridin
Trp	Tryptophan
U	Uracil
u. a.	unter anderem
UV/Vis	Ultraviolettes und sichtbares Spektrum (190 – 800 nm)
V	Volt
v. a.	vor allem
vgl.	vergleiche
z. B.	zum Beispiel
z. T.	zum Teil

Die in dieser Arbeit verwendete Nomenklatur orientiert sich an den *Chemical Abstracts*¹ und an den von der *IUPAC-IUB-Kommission*² empfohlenen Richtlinien. Fachausdrücke aus dem Englischen werden *kursiv* gedruckt.

¹ Chemical Abstracts, Index Guide, 77.

² a) IUPAC Commission on Nomenclature of Organic Chemistry (CNOC) und IUPAC-IUB Joint Commission on Biochemical Nomenclature (JCBN), *Biochemistry* **1971**, 10, 3983-4004.
b) IUPAC-IUB (CBN); Tentative Rules for Carbohydrate Nomenclature, *Eur. J. Biochem.* **1971**, 21, 455-477.

1 Motivation

Hätte man vor etwas mehr als 50 Jahren einem der Pioniere der Nukleinsäure-Forschung wie *Avery*, der 1944 DNA als Träger der Erbinformation identifizierte^[1], oder *Watson* und *Crick*, die 1953 die doppelhelikale Struktur der DNA aufklärten^[2] den heutigen Stand der Nukleinsäureforschung prognostiziert, so hätten einen diese wohl für verrückt erklärt. Mittlerweile engagieren sich Forscher aus verschiedenen Fachrichtungen, wie Medizin, Biologie, Chemie, Physik oder Materialwissenschaften in der Nukleinsäureforschung. Allein dieses Interesse zeigt, dass es sich bei der DNA um ein faszinierendes Molekül handelt. Dabei stehen unterschiedliche Fragestellungen und Eigenschaften der DNA im Mittelpunkt des Interesses.

In der Medizin beispielsweise erhofft man sich durch das zunehmende Verständnis der Vorgänge bei der DNA-Replikation, DNA-Schädigung, Genexpression und Genregulation neue revolutionäre Ansätze bei der Behandlung und Diagnostik der verschiedensten systemischen Krankheiten. Als Beispiel sei hier nur auf die Arbeiten von *Mello* und *Fire* verwiesen, für die sie 2006 mit dem Nobelpreis für Medizin ausgezeichnet wurden.^[3] Die steigende Bedeutung der DNA in der Medizin und der Mikrobiologie zog die Entwicklung zahlreicher Nachweisverfahren und bioanalytischer Methoden nach sich. Diese reichen vom Nachweis einer bestimmten DNA-Sequenz bis hin zur Detektion einzelner Basenfehlpaarungen bzw. Einzelbasenmutationen. Viele Methoden in der Nukleinsäureanalytik basieren auf fluoreszenten Sonden, da diese in der Lage sind verlässlich und sensitiv Veränderungen in ihrer Umgebung anzuzeigen.

Die Erforschung der DNA beschränkt sich heute aber nicht mehr nur auf biologische und medizinische Gesichtspunkte, stattdessen rücken immer mehr Anwendungen in der Nanotechnologie und materialwissenschaftliche Interessen in den Blickpunkt. DNA losgelöst von ihrer biologischen Bedeutung als Material zum Aufbau nanoskaliger, funktioneller Bauteile und Strukturen anzusehen, fällt uns zunächst schwer. So haben wir doch alle noch den Traum von der personalisierten Medizin oder von der Heilung unheilbar erscheinender Krankheiten im Kopf wenn wir „DNA-Forschung“ hören. Betrachtet man DNA dennoch nüchtern als Material mit besonderen Eigenschaften, so eröffnet sich ein faszinierender Forschungszweig, der

sich erst in den letzten Jahren entwickelt hat und in dem es noch viel Neues zu entdecken gibt. *Seeman et al.* waren die ersten, die gezielt komplexe Strukturen aus DNA aufbauten, indem sie sich die einzigartigen Basenpaarungseigenschaften zunutze machten.^[4] In der Zwischenzeit ist es möglich auch große dreidimensionale Strukturen aus DNA aufzubauen^[5], mit Hilfe von DNA-Templaten Proteine oder Nanopartikel präzise anzuordnen^[6] oder synthetische DNA-Maschinen zu konstruieren.^[7] Aufgrund ihrer Fähigkeit zur Speicherung von Informationen stellt DNA auch einen der aussichtsreichsten Kandidaten auf dem Weg zu molekularen Computern dar.^[8]

Trotz der scheinbar konträren Herangehensweisen und Forschungsschwerpunkte von Medizinern, Biologen, Chemikern, Physikern und Materialwissenschaftlern gibt es grundlegende Eigenschaften der DNA, die für alle Subdisziplinen der Nukleinsäureforschung gleichermaßen interessant erscheinen. Eine davon ist die Fähigkeit der DNA Ladung im Inneren der Doppelhelix zu transportieren.^[9-12] Während der oxidative Lochtransport, sowie die zugrundeliegenden Mechanismen und die biologische Bedeutung in den letzten 20 Jahren recht gut erforscht und verstanden wurde, wurde die Erforschung von reduktiven Elektronentransferprozessen erst in den letzten Jahren durch das gesteigerte Interesse an DNA in der Nanotechnologie vorangetrieben.^[13]

Es ist die Erforschung solcher grundlegender Eigenschaften, die den Reiz der Nukleinsäureforschung ausmacht. Das Bestreben zunächst zu verstehen wie fundamentale Prozesse ablaufen und dann im nächsten Schritt zu versuchen dieses Wissen anzuwenden um neue Möglichkeiten aufzuzeigen. Daran hat sich, obwohl die DNA-Forschung seither einen langen Weg hinter sich hat, seit den Anfängen mit *Avery*, *Watson* und *Crick* nichts geändert.

2 Themenstellung

Im Rahmen dieser Arbeit sollen Oligonukleotide mit unterschiedlichen Sonden funktionalisiert und die Eigenschaften der modifizierten Oligonukleotide untersucht werden. Dabei gliedert sich die Arbeit in drei große Teilbereiche:

Neue Fluoreszenzsonden für die DNA-Analytik

Im Rahmen dieser Arbeit sollen drei sehr langwellig emittierende Fluorophore (**M1** – **M3**) mit großen Stokes-Verschiebungen mittels Klick-Chemie an Oligonukleotide geknüpft und deren Eigenschaften in DNA untersucht werden. Zusätzlich sollen FRET-Prozesse zwischen den unterschiedlichen Fluorophoren untersucht werden.

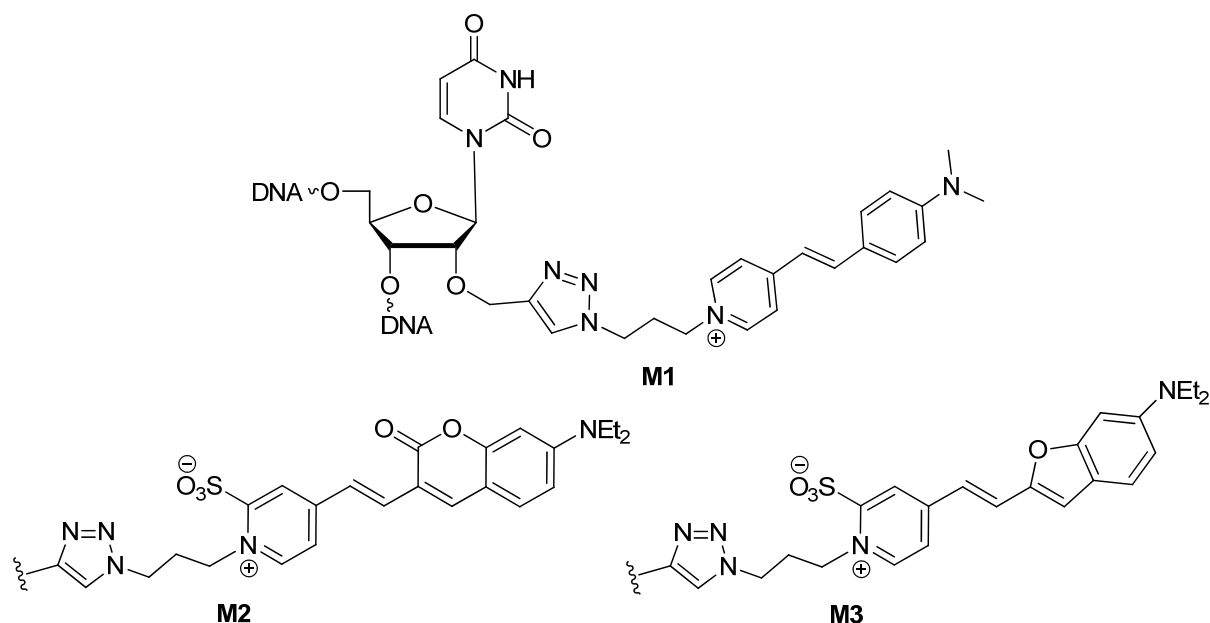


Abb. 1: Struktur der mit DNA verknüpften Farbstoffe **M1** – **M3**

Außerdem soll eine sehr hell leuchtende Fluoreszenzsonde auf Basis des Bodipy-Chromophors für die DNA-Analytik entwickelt werden. Dazu soll das Bodipy-Basensurrogat **Bo** synthetisiert und in Oligonukleotide eingebaut werden. Es sollen die optischen Eigenschaften von **Bo** in Abhängigkeit von der Umgebung im Oligonukleotid untersucht werden. Anhand der Ergebnisse soll dann **Bo** mit einem Bodipy-modifizierten Uridin aus der Arbeitsgruppe *Wagenknecht* verglichen werden.

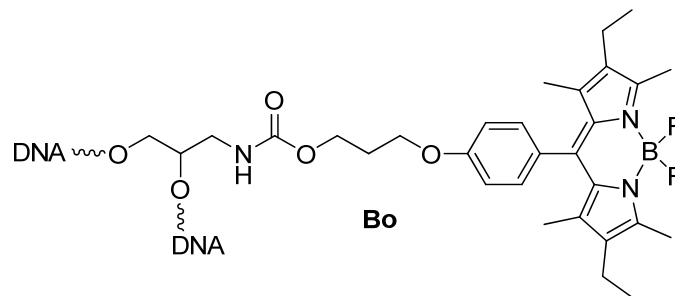


Abb. 2: Struktur des geplanten Bodipy-Basensurrogates in DNA

Nicht alle Fluorophore lassen sich mittels automatisierter Festphasensynthese in Oligonukleotide einbauen, weil sie zum Beispiel säurelabil sind oder die entsprechenden Phosphoramiditbausteine synthetisch nur schwer zugänglich sind. Aus diesem Grund sollen Nukleosidbausteine entworfen und synthetisiert werden, die eine sogenannte postsynthetische Modifikation von Oligonukleotiden mit Fluorophoren ermöglichen.

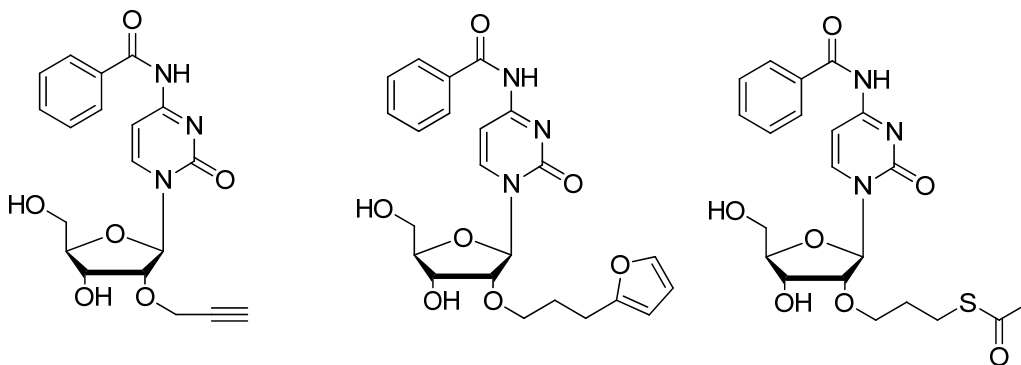


Abb. 3: Nukleosidbausteine zur postsynthetischen DNA-Modifikation

Metallkomplex/DNA - Konjugate

Der zweite Teil dieser Arbeit beschäftigt sich mit Metallkomplex/DNA - Konjugaten. Dabei soll die Verknüpfung von Oligonukleotiden durch Metallionen untersucht werden. Grundsätzlich lässt sich dabei zwischen zwei Arten der Verknüpfung unterscheiden, nämlich einer Verknüpfung der beiden Oligonukleotide innerhalb eines Doppelstranges, etwa durch metallionenvermittelte Basenpaare, und der Verknüpfung verschiedener Oligonukleotidduplexe durch Metallkomplexe.

Im Rahmen dieser Arbeit soll ein Hydroxychinolin-Ligandosid (**HQ**), welches in der Lage ist, mit Cu^{2+} -Ionen sehr starke metallionenvermittelte Basenpaare auszubilden, synthetisiert und in Oligonukleotide eingebaut werden. Anschließend soll die

Komplexierung von Cu^{2+} -Ionen und die Ausbildung eines metallionenvermittelten Basenpaares anhand der Schmelztemperaturen nachgewiesen werden.

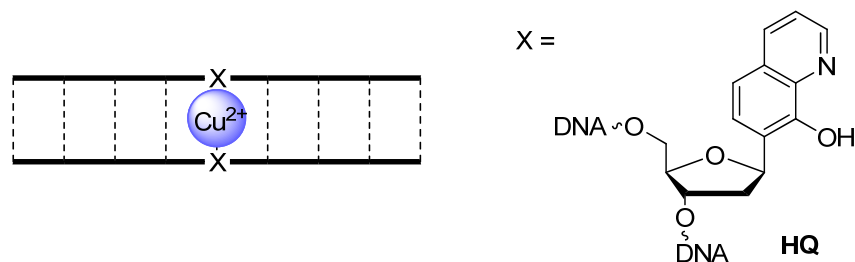


Abb. 4: Zielstruktur des Hydroxychinolin-Ligandosids in DNA und geplante metallionenvermittelte Basenpaarung.

Außerdem soll die Verknüpfung verschiedener Oligonukleotidduplexe über Metallkomplexe untersucht werden. Dabei ist für mögliche spätere Anwendungen in der Nanotechnologie wichtig, dass der verknüpfende Metallkomplex möglichst starr an die Oligonukleotide geknüpft ist und zusätzlich eine elektronische Kopplung zwischen den Oligonukleotiden und dem Metallkomplex ermöglicht wird. Daher soll ein an der 5-Position mit Terpyridin funktionalisiertes Uridin-Derivat (**TerpdU**) synthetisiert und in Oligonukleotide eingebaut werden.

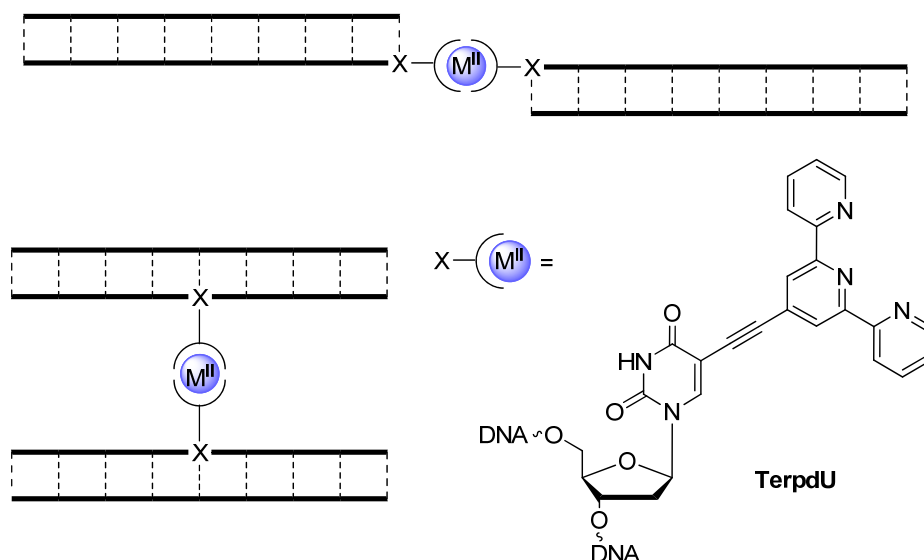


Abb. 5: Zielstruktur des terpyridinmodifizierten Uridins (TerpdU) in DNA und geplante Verknüpfung von Oligonukleotiden

Zunächst sollen die optischen Eigenschaften der terpyridinmodifizierten Oligonukleotide und anschließend die Verknüpfung von Oligonukleotidduplexen

durch Zugabe von Metallionen untersucht werden. Es soll herausgefunden werden, ob eine Verknüpfung mehrerer Oligonukleotide mit TerpdU möglich ist. Außerdem soll untersucht werden, welche Metallionen sich am besten für die Oligonukleotidverknüpfungen eignen und ob die Position der Terpyridin-Modifikationen innerhalb der Oligonukleotide einen Einfluss auf die Oligonukleotid-Konjugation hat.

Entwicklung neuer Ladungstransfersysteme

Im dritten Teil der Arbeit soll ein neuer nukleosidischer Elektronendonator auf Basis von 2PydU entwickelt und zur Untersuchung von Ladungstransferreaktionen in DNA eingesetzt werden. 2PydU besitzt großes Potential als Elektronendonator in DNA, allerdings mit zwei Einschränkungen - photoangeregtes 2PydU ist in der Lage Guanin zu oxidieren, d.h. unerwünschte oxidative Ladungstransferprozesse zu induzieren und die Triebkraft des reduktiven Elektronentransfers von 2PydU auf T und C ist sehr gering. Der neu entwickelte Elektronendonator soll demnach derart modifiziert werden, dass eine unerwünschte Guaninoxidation nicht mehr möglich ist und die Triebkraft für den reduktiven Elektronentransfer erhöht wird. Aufgrund der zu erwartenden Verschiebung der Redoxpotentiale wurde das dimethylaminopyren-substituierte Uridin DIMAPdU als Zielmolekül ausgewählt.

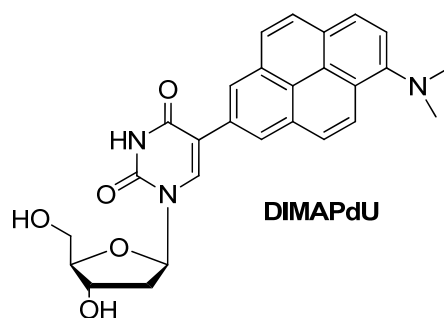


Abb. 6: Struktur des nukleosidischen Elektronendonors DIMAPdU

DIMAPdU soll synthetisiert und sowohl spektroskopisch als auch elektrochemisch charakterisiert werden. Zudem soll DIMAPdU in Oligonukleotide eingebaut und die spektroskopischen Eigenschaften in DNA untersucht werden. Durch transiente Absorptionsspektroskopie soll die Ausbildung des ladungsgetrennten $\text{DIMAP}^{+\bullet}\text{dU}^{\bullet-}$ Zustands nachgewiesen und die Ladungsinjektion in Oligonukleotide verfolgt werden.

Im letzten Abschnitt sollen verschiedene Ladungstransfersysteme mit DIMAPdU als Elektronendonator bzw. Lochakzeptor entwickelt und untersucht werden.

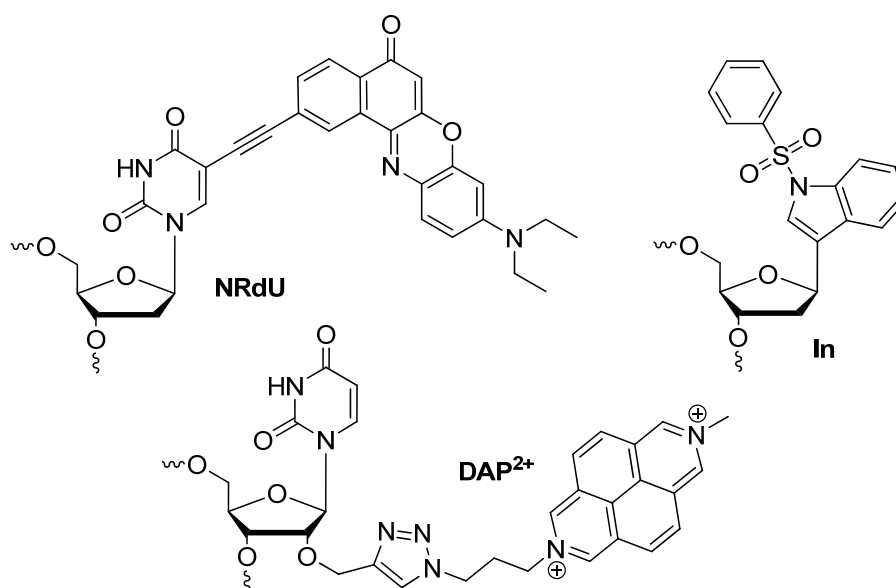


Abb. 7: Struktur der Ladungstransferpartner von DIMAPdU in Oligonukleotiden

Dabei soll im ersten System DIMAPdU zusammen mit einem nitro-modifizierten Uridin (NRdU) in Oligonukleotidduplexe eingebaut und der oxidative Lochtransfer von photoangeregtem NRdU auf DIMAPdU untersucht werden. Im zweiten System soll DIMAPdU als Elektronendonator mit einem *N*-Phenylsulfonylindol-Nukleosid (**In**) als Elektronenakzeptor kombiniert und der reduktive Elektronentransfer von photoangeregtem DIMAPdU auf **In** studiert werden. Im dritten Ladungstransfersystem sollen DIMAPdU und ein Dimethyldiazapyrenium-Derivat (**DAP²⁺**) zusammen in Oligonukleotidduplexe eingebaut werden. An diesem System soll sowohl der oxidative Lochtransfer von angeregtem **DAP²⁺** auf DIMAPdU als auch der reduktive Elektronentransfer von angeregtem DIMAPdU auf **DAP²⁺** untersucht werden. Anhand dieses Systems soll zusätzlich noch der Einfluss metallionenvermittelter Basenpaare auf den Ladungstransfer untersucht werden. Dazu sollen die natürlichen Basenpaare zwischen Ladungsdonor und -akzeptor durch hydroxychinolinvermittelte-Basenpaare ersetzt werden.

3 Theoretischer Hintergrund

3.1 Fluoreszenzspektroskopie

Molekulare Grundlagen

Ist ein Molekül durch Absorption eines Lichtquants in einen energetisch angeregten Zustand gelangt, so kann es u.a. durch Abgabe von Energie in Form von Licht wieder in den elektronischen Grundzustand zurückkehren. Diesen Vorgang bezeichnet man allgemein als Photolumineszenz, wobei man grundsätzlich zwischen Fluoreszenz und Phosphoreszenz unterscheidet. Fluoreszenz bezeichnet den Übergang aus einem elektronisch angeregten Zustand mit gleicher Spinmultiplizität wie der Grundzustand, meist aus dem S_1 - in das S_0 -Niveau. Die strahlende Relaxation erfolgt dabei während einer Zeitspanne von etwa 10^{-12} bis 10^{-9} s. Bei der Phosphoreszenz vergeht deutlich mehr Zeit zwischen Anregung und Lichtemission (ca. 10^{-4} bis 10^{-9} s), da es sich hierbei um einen spinverbotenen Übergang, also einen Übergang zwischen Zuständen unterschiedlicher Spinmultiplizität, handelt. Phosphoreszenz erfolgt üblicherweise vom T_1 - in den S_0 -Zustand.

Die Regel von *Kasha* ^[14] besagt, dass Lichtemission stets aus dem Schwingungsgrundzustand des elektronisch angeregten Zustandes erfolgt. Die Emissionswellenlänge ist damit unabhängig von der Absorptionswellenlänge. Die Anregung kann hingegen aus jedem besetzten Schwingungszustand des elektronischen Grundzustands heraus erfolgen. Da die Population der einzelnen Schwingungszustände temperaturabhängig ist und durch die *Boltzman-Verteilung* beschrieben wird, ist auch das Absorptionsspektrum temperaturabhängig.

Bei der strahlenden Relaxation gibt ein angeregtes Molekül Energie in Form eines Lichtquants der Frequenz $\nu = \Delta E / h$ ab. Die *Stokes-Regel* ^[15] besagt, dass die Energie des emittierten Photons geringer ist als die des absorbierten Photons, da ein Teil der aufgenommenen Energie durch strahlungslose Relaxation verloren geht. Damit erscheint das Fluoreszenzspektrum gegenüber dem Absorptionsspektrum in Richtung größerer Wellenlängen verschoben.

Die strahlende Relaxation bei der Fluoreszenz (und natürlich auch der Phosphoreszenz) steht in Konkurrenz zu strahlungslosen Übergängen, die meist auf einer schnelleren Zeitskala von ca. $10^{-12} - 10^{-14}$ s ablaufen. Zu den strahlungslosen Prozessen zählen die vibronische Relaxation (VR), die *internal conversion* (IC) unter Erhalt der Spinmultiplizität und das *intersystem crossing* (ISC), bei dem sich die Spinmultiplizität ändert. Einen Überblick über die unterschiedlichen Relaxationsprozesse gibt das sogenannte Jablonski-Diagramm.

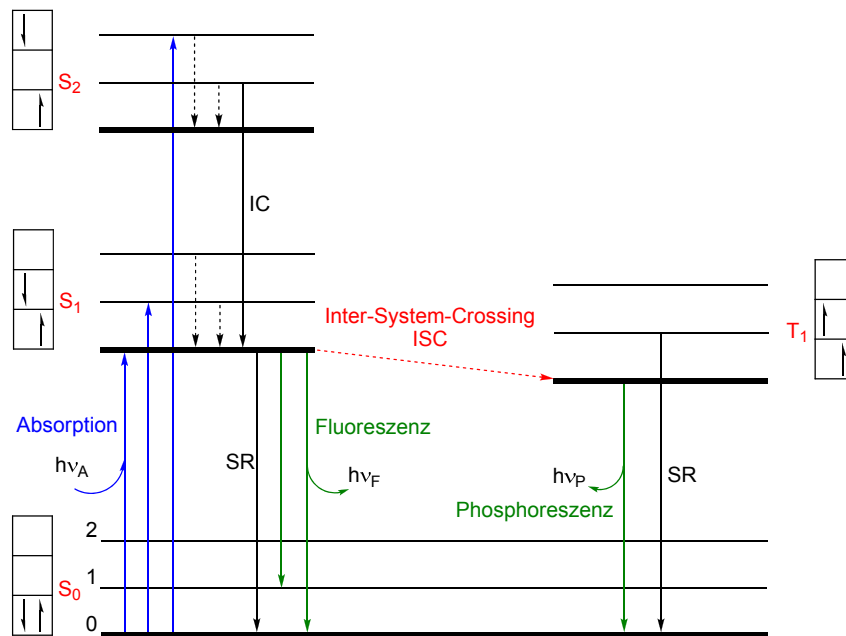


Abb. 8: Jablonski Diagramm zur Darstellung der wichtigsten Elementarschritte.

A = Absorption, F = Fluoreszenz, P = Phosphoreszenz, SR = Schwingungsrelaxation, ISC = intersystem crossing (Singulett-Triplett-Übergang), IC = internal conversion; S = Singulett-Zustand, T = Triplett-Zustand.

Wichtige Begriffe

Als Fluoreszenzquantenausbeute (Φ_F) bezeichnet man den Anteil der strahlenden an der gesamten Relaxation. Mit den Ratenkonstanten der verschiedenen Relaxationsprozesse lässt sich dies wie folgt ausdrücken:

$$\Phi_F = \frac{k_{\text{Fluoreszenz}}}{\sum k_{\text{Relaxation}}} = \frac{I_{\text{emittiert}}}{I_{\text{absorbiert}}}$$

Die Quantenausbeute einer Probe lässt sich sowohl direkt als auch indirekt bestimmen. In der direkten Quantenausbeutebestimmung wird eine

Versuchsanordnung verwendet, die durch einen sphärischen Detektor in der Lage ist alle Photonen innerhalb des Probenraums zu detektieren (*single photon counting*). Durch Messung der Zahl der von der Probe absorbierten Photonen und der Anzahl der emittierten Photonen lässt sich die Quantenausbeute direkt bestimmen. Allerdings funktioniert diese Methode für geringe Φ_F -Werte nur wenig zuverlässig. Aufgrund des apparativen Aufwands der direkten Quantenausbeutebestimmung bedient man sich oftmals einer indirekten Methode. Dabei vergleicht man die integrierte Fluoreszenz bei gleicher eingestrahlter Lichtmenge zwischen der zu untersuchenden Substanz und einer Referenzsubstanz mit bekannter Quantenausbeute. Die Quantenausbeute lässt sich nach folgender Formel berechnen:^[16]

$$\Phi_F(P) = \Phi_F(R) \cdot \frac{A(R) \cdot n_D^2(P) \cdot F(P)}{A(P) \cdot n_D^2(R) \cdot F(R)}$$

mit:	Φ_F :	Fluoreszenzquantenausbeute
	A:	Absorbanz bei Anregungswellenlänge
	n_D :	Brechungsindex des Lösungsmittels
	F:	integrierte Fluoreszenzintensität
	P:	Probensubstanz
	R:	Referenzsubstanz

Neben der Quantenausbeute wird oft auch die Helligkeit (*Brightness* B) eines Fluorophors angegeben. Diese berücksichtigt neben dem Emissionsverhalten auch das Absorptionsverhalten, also die Anregbarkeit (Extinktionskoeffizienten) eines Fluorophors und ist für sensorische Anwendungen oft entscheidender als Φ_F .

$$B = \varepsilon \cdot \Phi_F$$

Die Fluoreszenzlebensdauer τ ist der reziproke Wert der Ratenkonstanten der Fluoreszenzemission und repräsentiert die mittlere Lebensdauer des angeregten Zustands bevor eine Fluoreszenzemission auftritt.

$$\tau = \frac{1}{k_{\text{Fluoreszenz}}}$$

In Analogie zum *Lambert-Beer'schen Gesetz* für die Absorption gilt für die Fluoreszenz das *Gesetz von Parker*.

$$F = I_0 \cdot \varepsilon \cdot c \cdot d \cdot \Phi_F \cdot k$$

mit:	F:	Fluoreszenzintensität
	I_0 :	Intensität des Anregungslichtes
	ε :	dekadisch molarer Extinktionskoeffizient
	c:	Konzentration des Fluorophors
	d:	Schichtdicke der durchstrahlten Lösung
	Φ_F :	Quantenausbeute
	k:	Geometrieparameter

Allerdings ist die lineare Abhängigkeit zwischen Fluoreszenz und Konzentration nur im Falle kleiner Konzentrationen gegeben, da es bei höheren Konzentrationen zu Aggregationseffekten und Molekülwechselwirkungen kommen kann, die die Konstanz der Quantenausbeute stören.

Fluoreszenz Resonanz Energie Transfer

Beim sogenannten Fluoreszenz-Resonanz-Energie Transfer (FRET) handelt es sich um einen physikalischen Prozess, bei dem ein angeregter Fluorophor (Donor) seine Energie strahlungslos auf einen anderen Chromophor übertragen kann.^[17] Die Energieübertragung findet dabei direkt über Dipol-Dipol-Wechselwirkungen und nicht durch die intermediäre Aussendung eines Photons statt. Für einen solchen Energieaustauschprozess lässt sich die Ratenkonstante nach folgender Gleichung bestimmen.^[18]

$$k_{FRET} = \frac{1}{\tau_D} \left(\frac{R_0}{r} \right)^6$$

$$\text{mit: } R_0 = \left(\frac{8.79 \cdot 10^{23} \cdot \kappa^2 \cdot \Phi_D \cdot J(\lambda)}{n^4} \right)^{\frac{1}{6}}$$

mit:	k_{FRET} :	Ratenkonstante des Energietransfers
	τ_D :	Fluoreszenzlebenszeit des Donors in Abwesenheit des Akzeptors
	R_0 :	Förster Radius (Distanz bei 50% FRET-Effizienz)
	r:	Abstand zwischen Donor und Akzeptor
	κ :	Dipol-Dipol-Orientierungsfaktor
	Φ_D :	Quantenausbeute des Donors in Abwesenheit des Akzeptors
	$J(\lambda)$:	Spektrales Überlappintegral
	n:	Brechungsindex des Mediums zwischen den Chromophoren

Aus obigen Gleichungen lassen sich einige Voraussetzungen für effiziente FRET-Prozesse erkennen:

- Donor und Akzeptor müssen sich in räumlicher Nähe befinden (<10 nm)

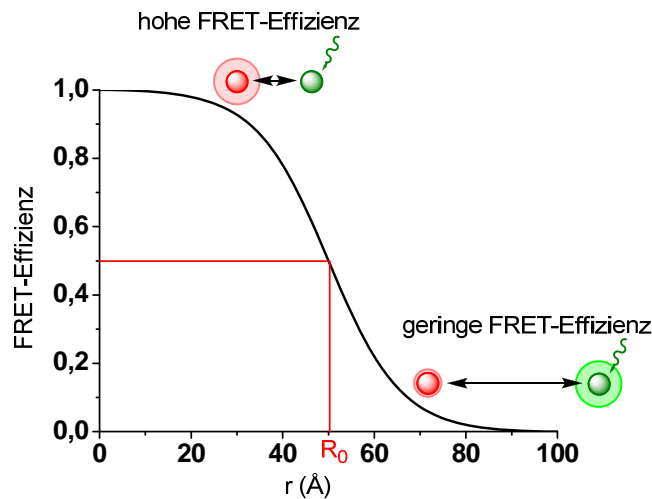


Abb. 9: Abhängigkeit der FRET-Effizienz vom Abstand zwischen Donor und Akzeptor bei einem Förster-Radius von 50 Å

- Ausreichend gute spektrale Überlappung der Donoremission und der Akzeptorabsorption

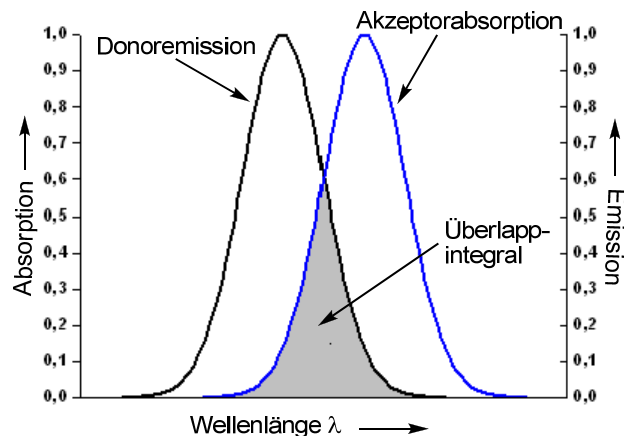


Abb. 10: Spektrales Überlappintegral zwischen der Donor-Emission und der Akzeptorabsorption

- Geeignete geometrische Anordnung (κ -Faktor)

Genau diese Voraussetzungen für einen effektiven Energietransfer-Prozess sind es, die FRET-Experimente mit Oligonukleotiden so interessant machen. Durch die DNA als Struktur-Templat lassen sich sowohl der Abstand zwischen Donor und Akzeptor,

als auch die Orientierung der Fluorophore zueinander (und somit auch der Übergangsdipolmomente) präzise festlegen. Ein Experiment, dass sowohl die Distanzabhängigkeit als auch die Abhängigkeit des FRET von der relativen Lage der Übergangsdipolmomente zueinander verdeutlicht, wurde von der Gruppe von *Wilhelmsson* durchgeführt.^[19] Dabei wurden fluoreszente DNA-Basenpaare verwendet, bei denen die relative Lage der Übergangsdipolmomente und der Donor-Akzeptor-Abstand durch die Geometrie der DNA-Helix bestimmt sind. Als Ergebnis wurde eine FRET-Effizienz erhalten, deren Maximalwerte zwar durch den Donor-Akzeptor-Abstand festgelegt sind, die allerdings zusätzlich durch die Orientierung der fluoreszenten Basenpaare und somit auch der Übergangsdipolmomente moduliert wurde.

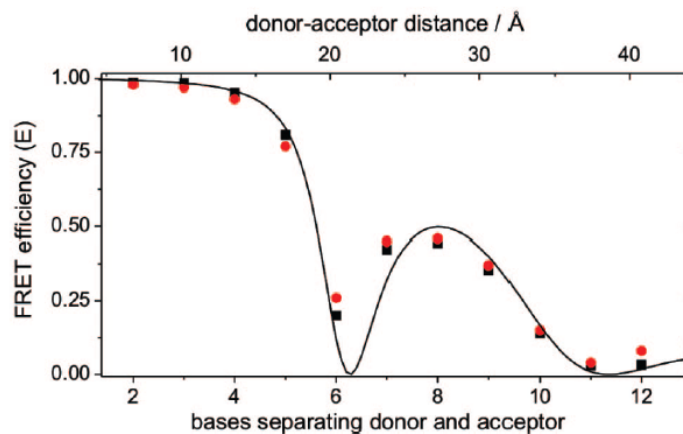


Abb. 11: Abhängigkeit der FRET-Effizienz vom Abstand und der Orientierung der Übergangsdipolmomente^[19]

3.2 Anknüpfungsmethoden für Sonden an Oligonukleotide

Für neue Anwendungsbereiche in der DNA-Nano- und Biotechnologie, Materialwissenschaften oder Diagnostik ist eine Funktionalisierung der DNA von entscheidender Bedeutung. Die Art der funktionellen Sonde und die gewählte Verknüpfungsmethode mit den Oligonukleotiden sind dabei vom Anwendungsbereich abhängig. So können beispielsweise Spin-Labels^[20, 21], Metall-Liganden^[22, 23] oder Fluoreszenzsonden^[24, 25] an Oligonukleotide geknüpft werden. Die Anknüpfung der entsprechenden Sonden an DNA kann neben der chemischen Synthese der entsprechenden Phosphoramidit-Bausteine und deren Einbau durch Festphasensynthese auch durch eine postsynthetische Funktionalisierung der DNA erreicht werden.

3.2.1 Einbau von Sonden während der Festphasensynthese

Es gibt verschiedene Möglichkeiten, um funktionelle Sondenmoleküle mit Oligonukleotiden zu verknüpfen. Je nach Anknüpfungsposition und verwendetem Phosphoramidit-Baustein lassen sie sich in verschiedene Klassen einteilen (vgl. Abb. 12). Die wichtigsten Methoden werden im Folgenden kurz erläutert.

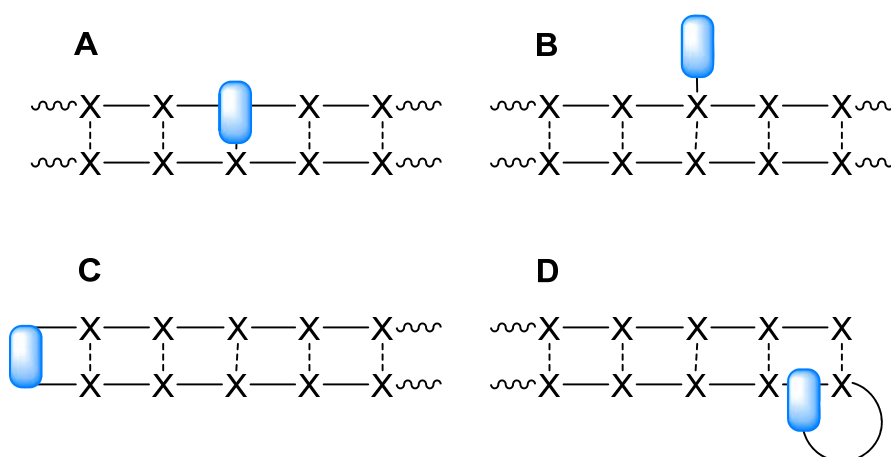


Abb. 12: Anknüpfungsmethoden für Fluoreszenzsonden: A) Einbau als Basensurrogat; B) Anknüpfung an ein Nukleosid; C) Kopfgruppe einer Haarnadelstruktur; D) Terminale Verknüpfung über einen Linker

- Einbau als artifizielle Nukleobase (Basensurrogat)

Die Sonde wird über eine Linker- oder eine Deoxyriboseeinheit kovalent als Basensurrogat im DNA-Rückgrat verankert und tritt in der Basensequenz an die Stelle einer natürlichen Nukleobase. Im Rahmen dieser Arbeit wurde dieser Ansatz für Bodipy und Hydroxychinolin gewählt.

- Kovalente Verknüpfung mit einem natürlichen Nukleosid

Das Sondenmolekül wird mit einem natürlichen Nukleosid verknüpft. Die Sonde sollte dabei möglichst in Richtung der großen Furche der DNA-Doppelhelix weisen, so dass die Basenpaarung nur wenig gestört wird. Im Rahmen dieser Arbeit wurde dieser Ansatz für Dimethylaminopyren, Nilrot und Terpyridin gewählt.

- Platzierung als Kopfgruppe einer DNA-Haarnadel

Die Sonde ist über Linkereinheiten in eine selbstkomplementäre DNA-Sequenz eingebaut. Der entstehende DNA-Strang ist in der Lage, eine Haarnadelstruktur auszubilden. Solche Strukturen sind recht stabil, nehmen meist eine B-DNA-Konformation ein und dissoziieren erst bei hoher Temperatur. Die Fluoreszenzsonde liegt auf dem Basenstapel und bildet die Kopfgruppe der DNA-Haarnadel.^[26, 27]

- Terminale Anknüpfung über einen Linker

Das Sondenmolekül wird über einen Linker kovalent mit dem 5'- oder 3'-Terminus des Oligonukleotids verknüpft. Durch Art und Länge des Linkers lässt sich die Flexibilität der Anbindung beeinflussen. Die Verwendung einer langen Linkergruppe gewährleistet die nötige konformative Freiheit, um eine Interkalation der Sonde in den Basenstapel zu ermöglichen. Nachteil dieser Methode ist der meist nicht genau definierte Ort der Interkalation.

3.2.2 Postsynthetische Modifikation von Oligonukleotiden

Der postsynthetische Ansatz bietet den Vorteil, dass auch Moleküle, die chemisch unter den Bedingungen der Festphasensynthese nicht stabil sind, in Oligonukleotid-Sequenzen eingebracht werden können. Es ist lediglich nötig, eine reaktive Gruppe während der Festphasensynthese einzubauen, über die später durch eine chemoselektive Reaktion eine Funktionalisierung stattfinden kann. Die ideale Reaktion für eine solche postsynthetische Verknüpfung muss spezifisch und bioorthogonal sein und mit hohen Ausbeuten unter milden Bedingungen ablaufen. Für in vivo Experimente sind zusätzlich noch Biokompatibilität und Toxizität von Bedeutung.

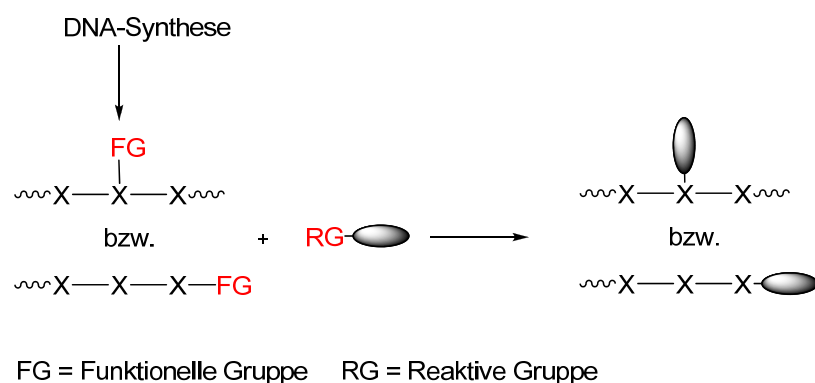


Abb. 13: Interne und terminale postsynthetische Modifikation von Oligonukleotiden durch Einbringen einer funktionellen Gruppe und Reaktion mit einer reaktiven Gruppe

Mittlerweile haben sich einige Methoden für die postsynthetische DNA-Modifikation etabliert. Das Einbringen eines nukleophilen Amins in Oligonukleotide und anschließende Umsetzung mit einer elektrophilen reaktiven Gruppe, sowie die Staudinger Ligation an DNA sind im Rahmen dieser Arbeit von untergeordneter Bedeutung und sollen hier nicht näher erläutert werden. Sie werden in einem sehr guten Übersichtsartikel von *Marx et al* genauer beschrieben.^[28]

Im Folgenden sollen drei Möglichkeiten zur postsynthetischen Modifikation von Oligonukleotiden näher erläutert werden, nämlich die Anknüpfung von Sonden über Thiol-Gruppen, Diels-Alder-Reaktionen und 1,3-dipolare Cycloaddition (Huisgen [2+3] Cycloaddition).

Anknüpfung über Thiol-Gruppen

Die Thiol-Gruppe des Cysteins wird in der Bioanalytik häufig verwendet, um Proteine zu markieren. In ähnlicher Weise können Oligonukleotide mit freien Thiol-Gruppen zur selektiven Reaktion mit verschiedenen Partnern, wie α -Halogenacetylen^[29, 30], Maleimiden^[31] oder aktivierten Disulfiden^[32] eingesetzt werden. Außerdem kann die starke Bindung an Gold zur Anbindung der Thiol-DNA an Gold-Nanopartikel oder Goldoberflächen eingesetzt werden^[33]. Die bisherigen Nachteile der Thiol-Anknüpfungsmethoden bestehen in der vorherigen Reduktion der eingebauten Disulfid-Bausteine und in der ausschließlich terminalen Modifikation von Oligonukleotiden.

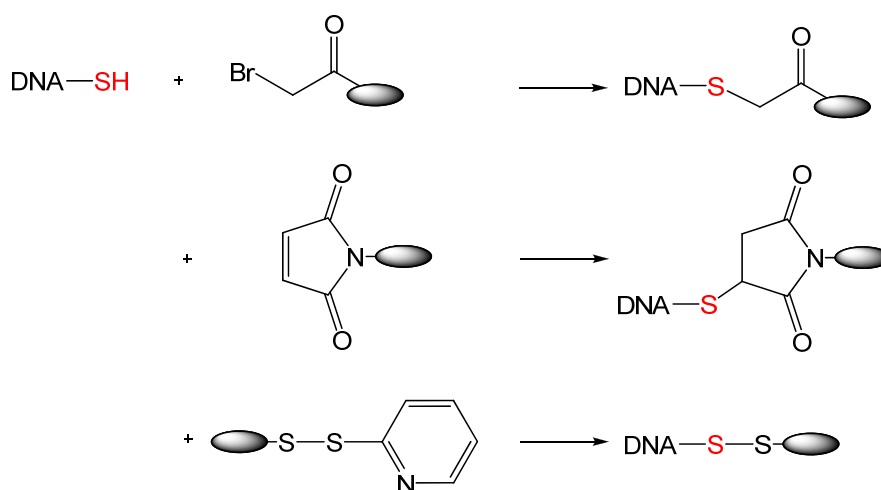


Abb. 14: Anknüpfungsmöglichkeiten an thiolmodifizierte Oligonukleotide

Anknüpfungen über Diels-Alder [4+2] Cycloadditionen

Diels-Alder-Cycloadditionen zwischen Dienen und Dienophilen sind C-C-Verknüpfungsreaktionen, die unter milden Bedingungen ablaufen. Die spezifische Reaktivität der beiden Funktionalitäten und die Beschleunigung solcher Reaktionen in wässrigen Lösungen machen sie für kovalente Biokonjugationen interessant.^[34-36] Allerdings sind Diels-Alder-Reaktionen im Prinzip reversibel. Ein großer Vorteil der Methode liegt in der kommerziellen Erhältlichkeit vieler maleimidfunktionalisierter Sonden, da diese häufig zur Proteinmarkierung eingesetzt werden.^[37-40]

Erste Versuche mit RNA zeigten die prinzipielle Anwendbarkeit für die Biokonjugation mit Nukleinsäuren.^[41, 42] Für die postsynthetische Modifikation am 5'-Ende der DNA wurden Cyclohexadien- und acyclische Hexadien-Phosphoramiditbausteine synthetisiert und in Oligonukleotide eingebaut.^[43] Versuche mit diversen

maleimidfunktionalisierten Labels, sowie eine Optimierung der Reaktionsbedingungen hinsichtlich pH-Wert, Temperatur und Label-Konzentration führten zu vollständigen Konjugationen in Reaktionszeiten von 30 min bis mehreren Stunden. Außerdem konnte auch eine Immobilisierung auf Oberflächen erreicht werden.^[44, 45] Es konnte gezeigt werden, dass sich auch Furan-Gruppen, die über einen Spacer an die 5-Position eines Uridins geknüpft sind als Dien-Komponente eignen. Dabei wurden fünf kommerziell erhältliche maleimidfunktionalisierte Farbstoffe innerhalb weniger Stunden Reaktionszeit quantitativ an DNA geknüpft.^[46] Ein weiteres Beispiel für eine DNA-interne Dien Komponente stellt 7-Vinyl-7-deaza-2'-deoxyguanosin dar, welches sich über das entsprechende Phosphoramidit in DNA einbauen lässt. Auch hier wurde die Konjugation mit verschiedenen mit Maleimid funktionalisierten Sonden, wie z.B. Pyren, TEMPO oder Biotin untersucht.^[47]

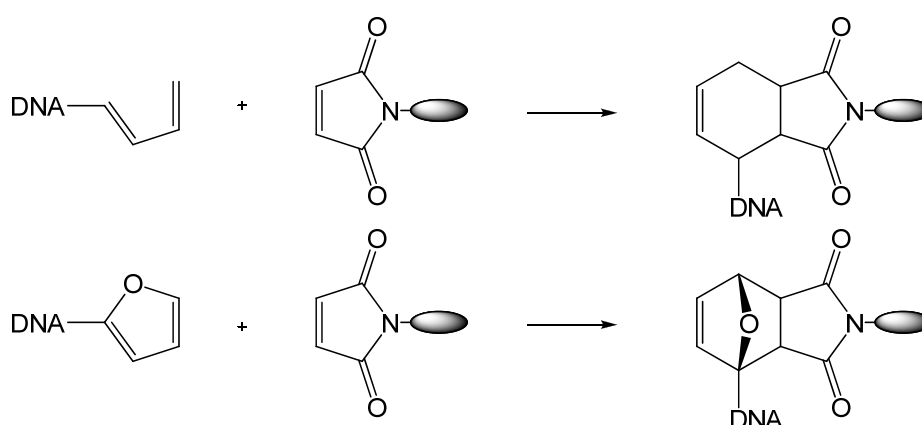


Abb. 15: Diels-Alder-Reaktionen an dienmodifizierten Oligonukleotiden

Anknüpfung über Huisgen [2+3] Cycloaddition (Klick-Reaktion)

Azid-Gruppen können mit Alkinen in einer [2+3] Cycloaddition unter Ausbildung stabiler Triazole reagieren.^[48] Unter Kupfer-Katalyse läuft die Reaktion bei Raumtemperatur und in wässrigen Lösungsmitteln ab. Im Falle terminaler Alkine erhält man im Produkt eine definierte Regiochemie.^[49] Durch die Bioorthogonalität sowohl der Azid als auch der Alkin-Funktionalität wurde die [2+3] Cycloaddition bald für Biokonjugationen^[50] (Klick-Chemie^[51, 52]) eingesetzt. Seither findet sie auf diesem Gebiet breite Anwendung.^[53]

Die erste Klick-Reaktion mit DNA wurde an einem 5'-Azido-funktionalisierten Oligonukleotid ohne Cu-Katalyse durchgeführt.^[54] Nach 72 h bei 80°C konnten 91 %

des gewünschten Produkts isoliert werden. Unter Kupfer(I)-Katalyse wurde mit einem terminalen Alkin ein vollständiger Umsatz ohne Strangbrüche bereits nach 2 h bei RT erreicht. Dieses Ergebnis war deswegen etwas überraschend, da Kupfer(I) die DNA schädigen könnte.^[55, 56] Die Gruppen von *Carell* und *Seela* untersuchten Klick-Reaktionen an 5-Oktadiinyl-2'-deoxyuridin und den entsprechenden Derivaten der anderen Nukleoside.^[57, 58] Alle Diinyl-Nukleotide konnten erfolgreich für Klick-Reaktionen an Oligonukleotiden eingesetzt werden.^[59] Durch den geschickten Einsatz von Schutzgruppen konnten *Carell et al.* schrittweise drei unterschiedliche Modifikationen regioselektiv an DNA klicken.^[60] Die Arbeitsgruppe *Wagenknecht* verwendet 2'-Alkin-funktionalisierte Uridine oder acyclische Basensurrogate für die Anknüpfung diverser Fluoreszenzsonden an DNA.^[61, 62] Die gleiche Arbeitsgruppe konnte zeigen, dass es möglich ist, alkinmodifiziertes Nilrot auf der festen Phase an in situ azidfunktionalisierte DNA zu konjugieren.^[63]

Die Anwendungsbereiche der Klick-Reaktion mit Oligonukleotiden gehen inzwischen weit über das reine Anheften von kleinen Molekülen hinaus. Mittlerweile wurden DNA-Peptid- und DNA-Nanopartikel-Konjugate oder Gold-Nanodrähte dargestellt.^[64-66] Die Klick-Reaktion wurde auch für DNA-Ligationen oder Cyclisierungen, sowie für die Immobilisierung auf Glasoberflächen eingesetzt.^[67-69]

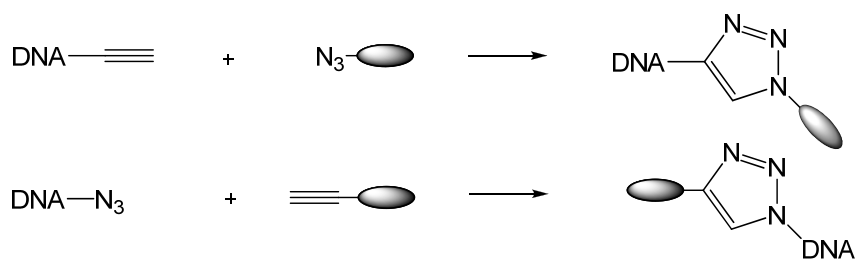


Abb. 16: Schematische Darstellung der Klick-Reaktion an DNA

3.3 Photoinduzierter Ladungstransfer in DNA

Bereits wenige Jahre nach der Aufklärung der helikalen Struktur der DNA durch *Watson* und *Crick* wurde von *Eley et al.* 1962 aufgrund der strukturell bedingten, ausgeprägten π,π -Wechselwirkungen der aromatischen Nukleobasen erstmals der Transport von Ladungen entlang der Helixachse vorgeschlagen.^[70] In den folgenden Jahren entbrannte eine heftige Diskussion darüber ob, und wie gut DNA in der Lage sei Elektronen zu transportieren. Dabei wurde in verschiedenen Publikationen DNA als molekularer Leiter, Halbleiter oder auch als Isolator bezeichnet.^[71-73] Das es von *Eleys* Idee bis zur systematischen Erforschung von Ladungstransferprozessen in DNA mehrere Jahrzehnte dauerte, lag zum einen daran, dass erst mit Entwicklung der automatisierten Festphasensynthese systematische Untersuchungen an definierten Basensequenzen möglich wurden.^[74-76] Zum anderen aber auch daran, dass das Interesse an Ladungstransferprozessen in DNA und den zugrundeliegenden Mechanismen erst in den letzten knapp 20 Jahren, mit Aufkommen der Nanotechnologie, deutlich anwuchs. Dabei spielte die Erkenntnis um die biologische Relevanz des Ladungstrfers in DNA eine wichtige Rolle. Auch Publikationen von *Barton et al.* über Ladungstransfer über längere Distanzen erregten das Aufsehen von Chemikern, Physikern und Materialwissenschaftlern.^[77, 78] In der Zwischenzeit ist die Tatsache, dass DNA Elektronen entlang der Helixachse transportieren kann unstrittig, und man unterscheidet je nach Art der beteiligten Orbitale zwischen zwei Arten von Ladungstransfer Prozessen, dem oxidativen Lochtransfer und dem reduktiven Elektronentransfer. In beiden Fällen handelt es sich um einen Transport von Elektronen, nur verläuft dieser beim oxidativen Lochtransfer HOMO-kontrolliert (Abb. 18), während er beim reduktiven Elektronentransfer LUMO-kontrolliert verläuft (Abb. 17).

In der Zwischenzeit rücken die mechanistischen Aspekte des Ladungstrfers in den Blickpunkt der Forschung. Dabei stehen das Superaustausch-Modell und der Hopping-Mechanismus im Vordergrund, die auch beide durch experimentelle Ergebnisse gestützt werden.^[79] Man weiß, dass Ladungstransferprozesse sehr schnell ablaufen und auch zu Reaktionen oder Schädigungen an Stellen der DNA führen können, die von der ursprünglichen Ladungsinjektionsstelle weit entfernt

liegen. Dies hat biologische Relevanz, weil oxidative Schädigungen der DNA oft bei Apoptose, Mutagenese und Krebsentstehung eine Schlüsselrolle spielen.^[80-82] Die leitenden Eigenschaften der DNA machen sie aber auch für diagnostische und technische Anwendungen interessant. Man kann beispielsweise mit Hilfe von DNA-Chips Einzelbasenmutationen oder andere DNA Schädigungen elektrochemisch detektieren oder auf DNA basierende Nanodevices bauen.^[83, 84]

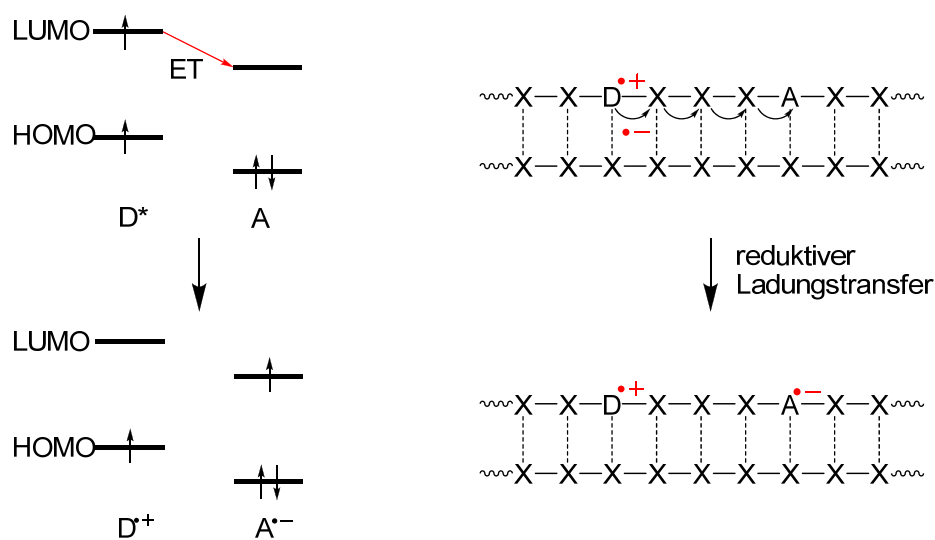


Abb. 17: Reduktiver Elektronentransfer: LUMO-kontrollierte Elektronenübertragung von einem photoangeregten Elektronendonator auf einen Akzeptor im Grundzustand

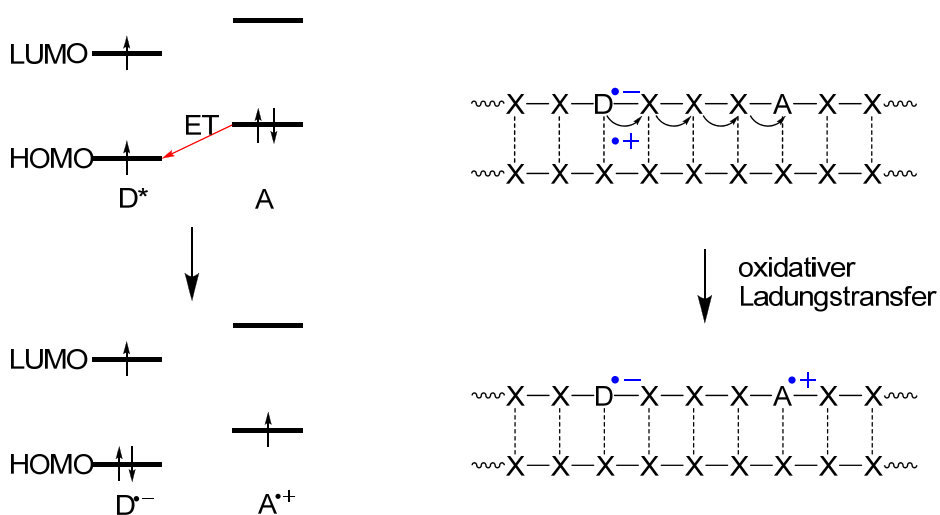


Abb. 18: Oxidativer Lochtransfer: HOMO-kontrollierter Lochtransfer von einem photoangeregten Lochdonor zu einem Akzeptor im Grundzustand

3.3.1 Mechanismus des Ladungstransfers durch DNA

Bei allen Ladungstransferprozessen bewegt sich ein Elektron aus einem Donor-Orbital zu einem Akzeptor-Orbital. Der Unterschied besteht nur in der Art der beteiligten Orbitale und den zugrundeliegenden Mechanismen. In einem so großen Biomolekül wie DNA werden solche Vorgänge allerdings aufgrund der Anzahl der beteiligte Atome und Orbitale dennoch recht komplex. Die zu Beginn gemachte Annahme, dass es sich bei den Ladungsüberträgern um Wassermoleküle, Ionen oder Phosphatgruppen aus dem DNA-Rückgrat handeln könnte, wurde mittlerweile widerlegt. Es ist vielmehr so, dass die Ladungstransferprozesse im inneren der DNA-Helix und durch die π -Orbitale der Nukleobasen vermittelt ablaufen. Mechanistische Untersuchungen des Ladungstransfers führten zu zwei Modellen, die als Superaustausch- und *Hopping*-Mechanismus bezeichnet werden.^[13]

Die Unterscheidung zwischen Superaustausch- und *Hopping*-Mechanismus kann nicht als eine Eigenschaft des entsprechenden Donor-Akzeptor-Systems angesehen werden. Vielmehr scheint es so zu sein, dass Ladungstransfer über kurze Distanzen in den meisten Systemen nach dem Superaustausch-Prinzip,^[85] weitreichender Ladungstransfer nach dem *Hopping*-Mechanismus verläuft.

Superaustausch-Mechanismus

Beim Superaustausch-Mechanismus erfolgt die Elektronenübertragung vom Donor zum Akzeptor über einen Tunnelprozess der Elektronen durch die DNA. Es entstehen keine intermediären Ladungsträger innerhalb der DNA-Brücke. Die DNA-Brücke wird als einziges großes Molekülorbital betrachtet, dessen energetische Lage und Länge für die Wahrscheinlichkeit des Tunnelvorganges entscheidend sind.

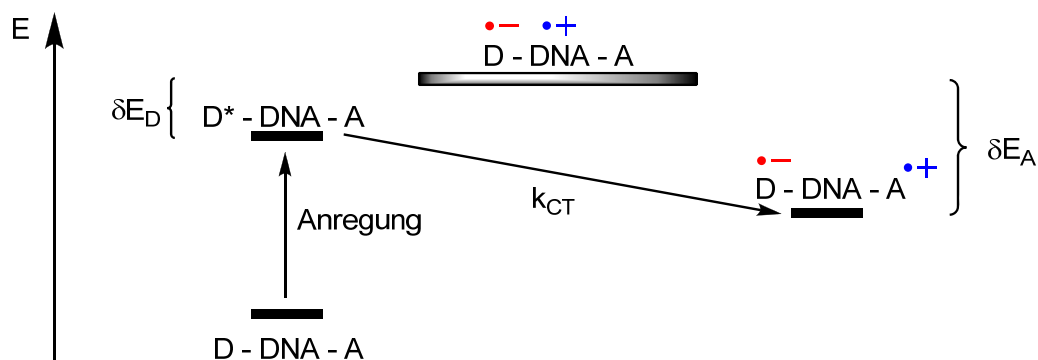


Abb. 19: Superaustausch-Mechanismus des Ladungstransfers; D = Donor, A = Akzeptor;

Die Abhängigkeit der Ratenkonstante für den Ladungstransfer k_{CT} vom Abstand zwischen Ladungsdonor und –akzeptor lässt sich gemäß der Elektronentransfer-Theorie nach Marcus folgendermaßen beschreiben:^[86]

$$k_{CT} = \frac{2\pi}{\hbar} \cdot \frac{V^2}{\sqrt{4\pi\lambda k_B T}} \exp\left(\frac{-(\Delta G_{ET} + \lambda)^2}{4\lambda k_B T}\right)$$

mit:	k_{CT}	Ratenkonstante des Ladungstransfers
	V^2	Matrizelement der elektronischen Kopplung zwischen Donor und Akzeptor
	λ	Reorganisationsenergie
	k_B	Boltzmannkonstante
	T	absolute Temperatur
	ΔG_{ET}	Triebkraft des Elektronentransfers

Das Matrizelement V für die elektronische Kopplung von Donor und Akzeptor hängt exponentiell vom Abstand zwischen Ladungsdonor und Ladungsakzeptor ab:

$$V^2 = V_0^2 \cdot e^{-\beta \cdot R}$$

mit:	V_0^2	Maximalwert von V^2
	β	Proportionalitätsfaktor
	R	Abstand zwischen Donor und Akzeptor

Aus der starken Distanzabhängigkeit von Superaustauschprozessen ergibt sich in DNA typischerweise eine Reichweite von max. 10 Å. Somit sind sie auf eine Entfernung von maximal 3 Basenpaaren beschränkt.

Zusätzlich zur Länge der Brücke spielen auch die energetische Lage der Donor- und der Brücken-Orbitale für die Ladungstransferraten eine entscheidende Rolle. Der Proportionalitätsfaktor β nimmt für steigende Energiedifferenzen nach folgender Gleichung zu:

$$\beta = \frac{2}{a} \cdot \ln \left[\frac{\Delta \varepsilon}{2V} + \sqrt{1 + \frac{\Delta \varepsilon^2}{4V^2}} \right]$$

mit:	a	Distanz zwischen benachbarten Untereinheiten
	V	Kopplung zwischen benachbarten Untereinheiten
	$\Delta \varepsilon$	Energiedifferenz zwischen Donor und Brücke

Wird $\Delta\varepsilon$ kleiner als V , so ist auch eine direkte Injektion der Ladungsträger in die Brücke anstatt eines Tunnelungsprozesses möglich. Daher ist der Mindestwert von β auf etwa $0.2 - 0.3 \text{ \AA}^{-1}$ limitiert.^[87]

Ein Ladungstransport über Distanzen von mehr als 50 \AA ist mit dem Superaustausch Mechanismus aufgrund der starken Distanzabhängigkeit nicht in Einklang zu bringen. Selbst wenn man β -Werte von 0.1 \AA^{-1} zugrunde legt, nimmt k_{CT} bei einer Distanz von 200 \AA um über acht Zehnerpotenzen ab.^[88] Da Untersuchungen zum weitreichenden Ladungstransfer jedoch weitaus geringere Distanzabhängigkeiten ergaben, musste das Superaustausch-Modell ergänzt werden. *Giese et al.* und *Jortner et al.* schlugen dafür den *Hopping*-Mechanismus als Alternative vor.^[79, 89]

Hopping-Mechanismus

Im Unterschied zum Superaustausch-Mechanismus werden beim Hopping-Mechanismus die Elektronen in mehreren Schritten über die DNA-Brücke vom Ladungsdonor zum -akzeptor transferiert. Dabei entstehen intermediäre Ladungsträger innerhalb der DNA-Brücke. Die Distanzabhängigkeit von k_{CT} ist dabei vernachlässigbar, da lange und langsame Tunnelungsschritte vermieden werden. Der kritische Faktor in diesem Modell ist die Anzahl der Hopping-Schritte, die für eine Ladungsübertragung nötig sind. Die resultierende Ratenkonstante lässt sich folgendermaßen ausdrücken:^[10, 79]

$$k_{CT} = P \cdot N^\eta$$

mit:	k_{CT} :	Ladungstransferrate
	P :	Wahrscheinlichkeit eines Hopping-Schrittes
	N :	Gesamtzahl der Hopping-Schritte
	η :	empirische Konstante ($1 \leq \eta \leq 2$)

Oxidativer Lochtransfer:

Für den oxidativen Lochtransfer sind aufgrund der Oxidationspotentiale der DNA-Basen, für die die Reihenfolge $E_{ox} (G/G^{++}) < E_{ox} (A/A^{++}) < E_{ox} (C/C^{++}) \approx E_{ox} (T/T^{++})$ ermittelt wurde,^[90, 91] Guaninradikalkationen G^{++} die besten intermediären Ladungsträger. *Lewis et al.* konnten die Rate $k_{HOP(G)}$ für oxidativen Ladungstransfer von einem G auf GG bestimmen. Sie liegt bei $k_{HOP(G)} = 5 \cdot 10^7 \text{ s}^{-1}$.^[10]

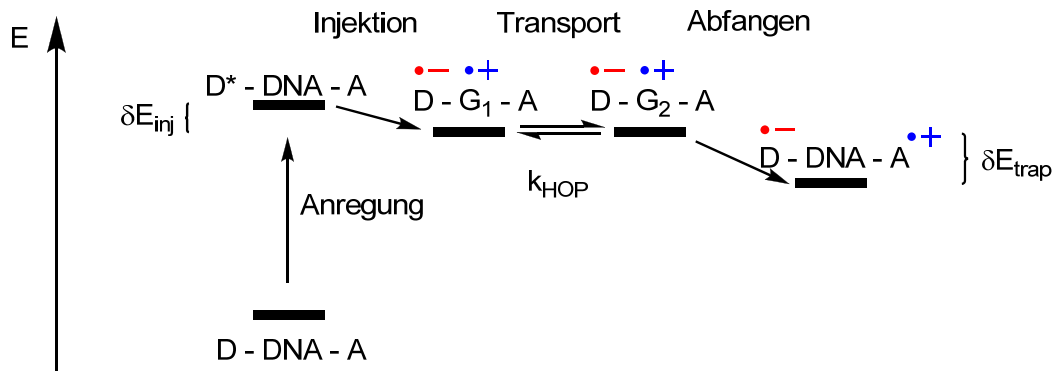


Abb. 20: Oxidativer Lochtransfer nach dem Hopping-Mechanismus. Guaninradikal-Kationen innerhalb der DNA-Brücke fungieren als intermediäre Ladungsträger.

Giese *et al.* zeigten, dass Hopping auch über längere AT-Sequenzen ($n = 4, 5$) stattfindet, was mit dem *G-Hopping*-Mechanismus nicht erklärt werden kann.^[92] Sie postulierten daher, dass das *Hopping* auch über Adenine bzw. Adeninradikalkationen A^{*+} möglich ist.^[93] Die Rate für einen *A-Hopping*-Schritt konnte zu $k_{HOP(A)} = 10^{10} \text{ s}^{-1}$ bestimmt werden.^[94] Damit verläuft *A-Hopping* schneller und effizienter als *G-Hopping*, was zu einer verringerten Wahrscheinlichkeit von oxidativen Schädigungen an Adeninen im Vergleich zu Guaninen führt. Erklären lässt sich diese Tatsache über Protonentransfereffekte, die in DNA mit Ladungstransferprozessen einhergehen.

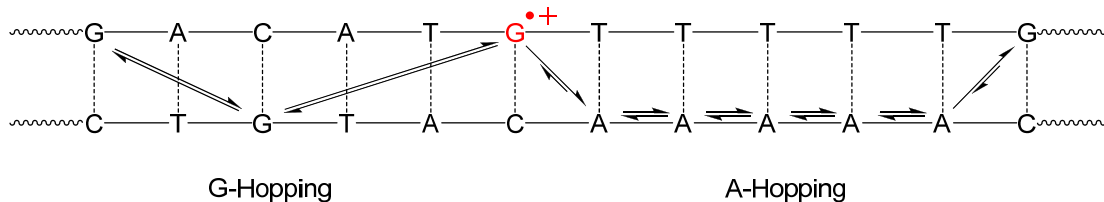


Abb. 21: Änderung der intermediären Ladungsträger beim Lochtransfer über längere AT-Sequenzen

Reduktiver Elektronentransfer:

Beim reduktiven Elektronentransfer ist aufgrund der von Seidel *et al.* publizierten Reduktionspotentiale der Nukleobasen in der Reihenfolge $E_{red}(T/T^{\cdot-}) \approx E_{red}(dU/dU^{\cdot-}) \approx E_{red}(C/C^{\cdot-}) < E_{red}(A/A^{\cdot-}) < E_{red}(G/G^{\cdot-})$ ^[90] anzunehmen, dass die Pyrimidin-Radikalanionen $T^{\cdot-}$ und $C^{\cdot-}$ als intermediäre Elektronenträger fungieren.^[95] Es wird daher angenommen, dass bei reduktiven Elektronen-Hoppingprozessen alle Basenpaare, also $-TA-$ und $-CG-$, beteiligt sind. Das Elektronenhopping über $T^{\cdot-}$ als Ladungsträger funktioniert jedoch etwas besser, da T in DNA ein etwas niedrigeres Reduktionspotential aufweist als C. Außerdem zeigen $T^{\cdot-}$ und $C^{\cdot-}$ deutlich

unterschiedliche Basizitäten.^[96, 97] Die Protonierung von C⁻ in GC-Basenpaaren durch die Gegenbase oder Wasser verringert die Effizienz des Ladungstransports. Dieser sog. protonengekoppelte Elektronentransfer ist der Grund dafür, dass reduktive Elektronentransferprozesse über AT-Basenpaare effizienter ablaufen als über GC-Basenpaare.

3.3.2 Einflußgrößen auf den Ladungstransport in DNA

Elektronische Kopplung des Donors/Akzeptors mit der DNA

In den ersten Messungen zum DNA-kotrollierten Ladungstransport (*charge transport*, CT) wurden sowohl in Photooxidationsexperimenten, als auch in elektrochemischen Experimenten Werte für k_{CT} und Leitfähigkeiten gefunden, die um mehrere Zehnerpotenzen variierten.^[72, 98] Die gleichen Beobachtungen wurden auch für Messungen an anderen molekularen Brücken mittels Rastertunnelmikroskopie (STM) gemacht.^[99] Der Grund liegt darin, dass für kurze molekulare Brücken die elektronische Kopplung zwischen der Brücke und dem Donor / Akzeptor die gemessenen Leitfähigkeiten maßgeblich bestimmt. Dies wurde sowohl theoretisch als auch experimentell belegt.^[99, 100] Analog dazu kann auch bei DNA-Brücken die elektronische Kopplung des Donors / Akzeptors mit den π -Orbitalen des Basenstapels, welche als Brücke für die Ladungsträger fungieren, die Raten und Ausbeuten des Ladungstransfers drastisch beeinflussen.^[12, 101-103]

Strukturelle Faktoren

Es ist nicht weiter verwunderlich, dass die konformationelle Überstruktur der DNA die Ergebnisse der Ladungstransferexperimente nachhaltig beeinflusst. Daher spielen Faktoren wie Hydratisierungsgrad, Temperatur, Hybridisierungsgrad, Basensequenz oder Salzgehalt der Probe eine entscheidende Rolle. Diese können die Konformation der DNA-Helix beeinflussen und beispielsweise zur Ausbildung von A- oder Z-DNA führen, was wiederum durch veränderte π - π Wechselwirkungen zu einer Änderung der Leitfähigkeit führt. Viele stark unterschiedliche Ergebnisse in Leitfähigkeitsstudien können auf Unterschiede in der Probenvorbereitung und bei den Messbedingungen zurückgeführt werden, da auch diese die DNA-Struktur beeinflussen können.^[98]

Messungen, bei denen die native Struktur der DNA-Helix erhalten bleibt und bei denen die DNA-Brücke kovalent mit den Elektroden verknüpft ist, liefern auch sehr ähnliche und verlässliche Werte für die Leitfähigkeiten.^[104-106]

Interessant ist auch der Vergleich des Ladungstransfers von Base zu Base im gleichen Strang oder in den gegenüberliegenden Strang eines Oligonukleodid-Duplexes. In B-DNA findet man für Ladungstransfer innerhalb des gleichen Strangs eine um drei Zehnerpotenzen höhere Rate im Vergleich zu Ladungstransfer in den hybridisierten Gegenstrang. π - π Wechselwirkungen sind in B-DNA innerhalb desselben Strangs viel besser möglich und eine Ladungsübertragung in den Gegenstrang muss somit teilweise über H-Brücken erfolgen. In A-DNA treten auch gute π - π Wechselwirkungen mit den Basen des Gegenstrangs auf und man erhält vergleichbare Raten für beide Ladungstransferprozesse.^[88]

Neben Änderungen der gesamten DNA-Struktur können auch kleine, lokale Veränderungen der Basenstapelung deutliche Effekte auf die Ladungstransfereigenschaften haben. Basenfehlpaarungen, Abasic sites und andere destabilisierende Defekte führen zu verringerten π - π Wechselwirkungen und somit zu einer geringeren Ladungstransfereffizienz.^[107, 108] Dieser Effekt kann zur Detektion von Basenfehlpaarungen verwendet werden.^[109-112] Auch andere kleine Defekte verringern Ladungstransferprozesse. Beispiele hierfür sind die Guaninoxidationsprodukte 8-Oxoguanin und O⁶-Methylguanin.^[108] In Zellen können auch DNA-Protein-Wechselwirkungen zu veränderten Leitfähigkeiten führen, darauf soll allerdings hier nicht näher eingegangen werden.

Zusammenfassend bleibt festzuhalten, dass eine möglichst effiziente π -Stapelung innerhalb der DNA-Brücke nötig ist, um optimale Ladungstransfereigenschaften zu erreichen.

Konformationelle Schaltung („Conformational Gating“)

Die Elektronentransferrate und –effizienz hängt, wie oben bereits erwähnt, von der Struktur der DNA-Brücke zwischen Donor und Akzeptor ab. Bei einem großen Biomolekül wie DNA handelt es sich natürlich nicht um ein starres Gebilde, so dass jedes einzelne DNA-Molekül in einer Probe seine Konformation ständig dynamisch verändert. Eine Gleichgewichtsstruktur unter bestimmten Bedingungen gibt nur einen gemittelten Wert über ein solches dynamisches Strukturensemble wieder. Sind

solche Strukturveränderungen groß genug, und ihre Geschwindigkeit ist geringer als die des Ladungstransfers im Gleichgewichtszustand, so kann man die Ladungstransferrate nicht mehr mit einer einfachen Ratenkonstante ausdrücken. Man muss die Dynamik und die Raten für verschiedene Konformationen berücksichtigen.^[113] Da der Ladungstransfer durch solche strukturellen Veränderungen je nach Konformation entweder ermöglicht oder unterdrückt werden kann, spricht man in diesem Zusammenhang von einer konformationellen Schaltung des Ladungstransfers. Interessanterweise erhöht eine beschleunigte Konformationsdynamik der DNA-Moleküle durch Temperaturerhöhung die Ladungstransferraten, anstatt sie, wie in klassischen Leitern oder Halbleitern, zu erniedrigen. Untersuchungen mit photoangeregtem 2-Aminopurin als Lochdonor und Guanin als Lochakzeptor haben gezeigt, dass die Gleichgewichtskonformation der DNA nicht die aktive Konformation für Ladungstransfer über längere Distanzen darstellt und dass erst das „*Conformational Gating*“ die Ausbildung der aktiven Konformationen für die jeweiligen Ladungsübertragungsschritte ermöglicht.^[111, 114] Dabei kann zum einen die Reorientierung des Ladungsdonors zur DNA der geschwindigkeitsbestimmende Schritt sein, um die CT-aktive Konformation zu bilden. Zum anderen kann auch die Ausbildung der CT-aktiven Konformation in der DNA-Brücke selbst der geschwindigkeitsbestimmende Schritt bei Ladungstransferprozessen sein.^[115, 116]

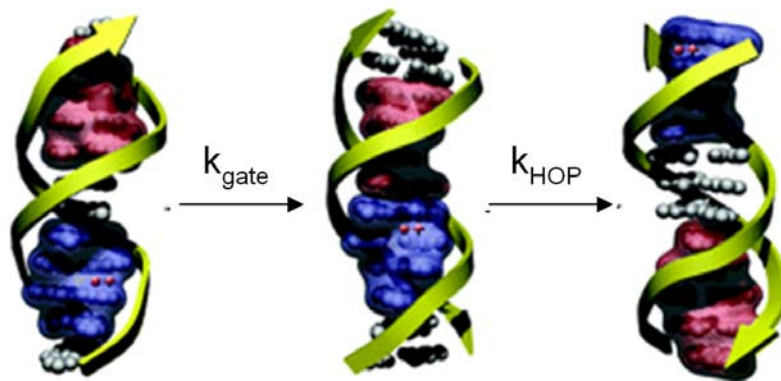


Abb. 22: Einfluss des *Conformational Gatings* auf den Ladungstransfer am Beispiel des oxidativen Lochtransfers von 2-Aminopurin auf Guanin^[114]

Elektronenrücktransfer

Einer photoinduzierten Ladungstrennung folgt zwangsläufig auch eine Ladungsrekombination, dies wird auch als Elektronenrücktransfer („Back Electron Transfer“, BET) bezeichnet. Der Einfluss des BET hängt vom untersuchten System ab. Will man den ladungstrennten Zustand anhand der relativ langsamen Oxidation des Guanin-Radikalkations untersuchen, so erhält man Raten die durch den Elektronenrücktransfer mitbestimmt werden. So konnte gezeigt werden, dass Systeme mit 2-Aminopurin oder Thionin als Lochdonor zwar zu einer effizienten Ladungstrennung, aufgrund des BET aber nicht zur Bildung von stabilen Oxidationsprodukten des Guanins führen.^[117, 118]

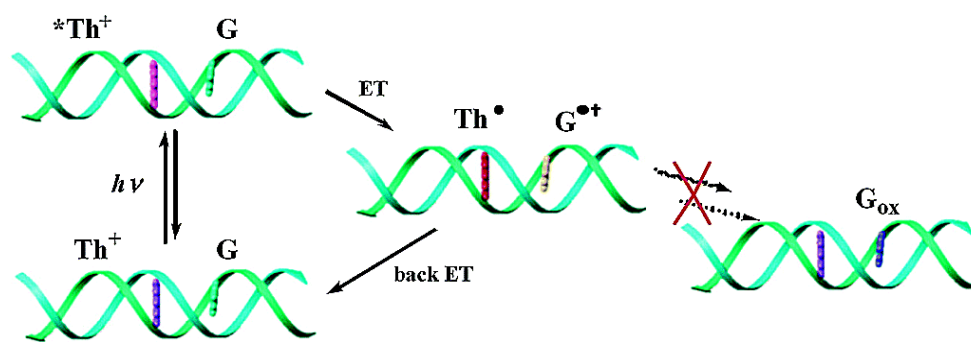


Abb. 23: Schematische Darstellung des Lochtransfers von Thionin auf Guanin und des Ladungsrücktransfers^[118]

BET-Effekte spielen besonders bei Ladungstransferexperimenten über kürzere DNA Brücken eine wichtige Rolle, da die Ladungsrekombination eine steilere Distanzabhängigkeit aufweist als die Ladungstrennung. Dies wurde anhand von Acridinium (Acr^+) / Phenothiazin (Ptz) und Naphthalimid / Ptz Systemen von *Majima et al.* untersucht.^[119-122]

Injektions- und Migrations-Effekte

Bei Untersuchungen mit elektronisch gut gekoppelten Donoren und Akzeptoren wurden deutlich unterschiedliche Ladungstransfer-Ausbeuten und Raten erhalten. Die schnellsten Raten wurden für das $\text{Ru}^{\text{II}*}/\text{Rh}^{\text{III}}$ - System, für die Oxidation von Deazaguanin mit photoangeregtem Ethidium und für die Reduktion von Rh^{III} mit photoangeregtem Ethidium erhalten.^[77, 115, 123, 124] Die Oxidation von Guanin mit photoangeregtem 2-Aminopurin oder photoangeregtem Stilben verläuft deutlich

langsamer.^[125, 126] Dieser Trend gibt die relative Stapelung der Donoren und Akzeptoren wieder. Um die Ergebnisse richtig erklären zu können, muss man allerdings zusätzlich noch elektrostatische Effekte auf die Ladungswanderung mit einbeziehen.^[113] Eine lokale Ladung kann starken Einfluss auf die Ladungstransferrate und die BET-Rate haben. Bei geladenen Ladungsdonoren wie Ethidium tritt im Gegensatz zu ungeladenen Donoren wie 2-Aminopurin nach der Ladungsinjektion keine Ladung mehr an der Injektionsstelle auf. Das bedeutet, dass der Ladungstransport weg von der Injektionsstelle nicht durch Coulomb-Anziehung behindert wird. In biologischen Systemen ist das erste Oxidationsprodukt meist ein Guanin-Radikalkation und es befindet sich kein Radikalanion auf der DNA. Somit wirken auch hier keine den Ladungstransport behindernden Coulombkräfte.

Protonengekoppelter Elektronentransfer

Wenn einer der am Ladungstransfer beteiligten Partner eine Säure oder Base ist, so haben dessen Oxidations-/Reduktionsprodukte oftmals stark geänderte pK_a -Werte. In solchen Fällen ist es wahrscheinlich, dass der Ladungstransfer an einen Protonentransfer gekoppelt ist (*Proton Couplet Electron Transfer*, PCET).^[127] In biologischen Systemen ist PCET eher die Regel als die Ausnahme, da die meisten redoxaktiven Gruppen in biologischen Systemen auch protoniert / deprotoniert werden können und der pK_a -Wert von der Oxidationsstufe abhängt.

In der DNA-Doppelhelix ist jede DNA-Base über H-Brücken mit ihrer Gegenbase verknüpft. Es ist daher nicht weiter verwunderlich, dass Ladungstransferprozesse in DNA protonengekoppelt ablaufen. Der erste Protonentransfer tritt dadurch auf, dass die Injektion eines Elektrons oder eines Lochs zu stark geänderten pK_a -Werten führen.^[128, 129] Oxidierte DNA-Basen werden deutlich acider, während reduzierte DNA-Basen oftmals um mehrere pK_a -Werte basischer werden.^[128] Dadurch können Protonentransferreaktionen zwischen den H-Brücken-Bindungspartnern ausgelöst werden (Abb. 24).

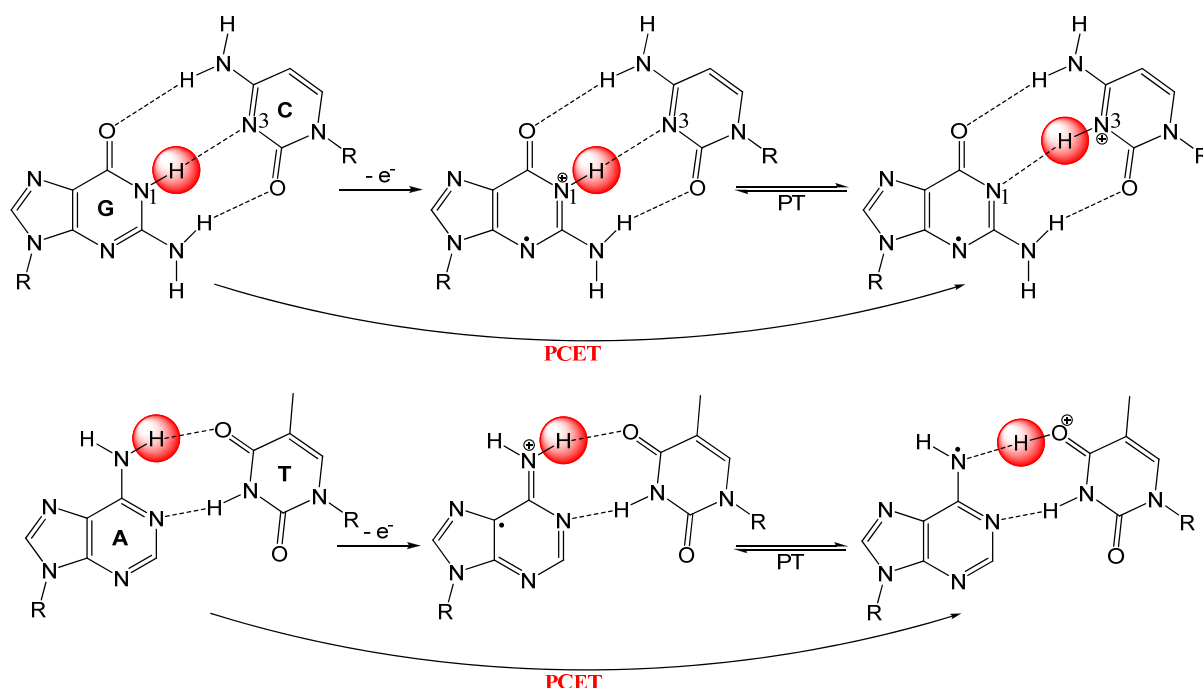


Abb. 24: Protonengekoppelter oxidativer Lochtransfer in GC und AT Basenpaaren.

Der Einfluss solcher PCET-Effekte soll im Folgenden kurz erläutert werden. Beim oxidativen Lochtransfer bildet sich zunächst ein G^+-C Basenpaar aus. Durch den anschließenden Protonentransfer bildet sich ein Gleichgewicht zwischen G^+-C und $G(N_1-H)^+-C(+H^+)$ aus, dass etwas zugunsten der Protonentransfer-Spezies verschoben ist.^[129] Der Lochtransfer findet aus der G^+-C –Form heraus statt, d.h. durch den PT-Prozess wird die Ladungstransferrate verringert. In oxidierten A^+-T -Basenpaaren sind solche PT-Prozesse nach theoretischen Rechnungen endergonisch^[130] und es wird sich nur ein sehr geringer Anteil an PT-Spezies im Gleichgewicht ausbilden. Deshalb sind auch die Raten für *A-Hopping* größer als die für *G-Hopping*.

Beim reduktiven Elektronentransfer bilden sich als intermediäre Ladungsträger $T^{\cdot-}$ und $C^{\cdot-}$ aus. Ein PT tritt allerdings nur für $G-C^{\cdot-}$ -Basenpaare auf. Das Gleichgewicht liegt auf der Seite der PT-Spezies ($G(N_1-H)^+-CH^{\cdot-}$). Da der Elektronentransfer aber aus der $G-C^{\cdot-}$ -Spezies heraus stattfindet, werden die ET-Raten verringert. Deshalb sind die Raten für reduktiven Elektronentransfer über AT-Basenpaare größer als für GC-Basenpaare.

3.3.3 Untersuchungen zum photoinduzierten Ladungstransfer

Zur Erforschung des photoinduzierten Ladungstrfers muss die DNA mit photoanregbaren redoxaktiven Sonden, die zur Erzeugung und Injektion der Ladung notwendig sind, modifiziert werden. Die Art der Anknüpfung der Sonden an die DNA hängt dabei von den verwendeten Sondenmolekülen, der gewünschten Orientierung und der synthetischen Zugänglichkeit der entsprechenden Bausteine ab. Die Einführung der Sonden in die DNA kann nach verschiedenen Methoden geschehen.^[131] Diese entsprechen im Wesentlichen den Verknüpfungsmethoden, die bereits diskutiert wurden (vgl. Abb. 12).

Die Triebkraft von Ladungstransferreaktionen kann mit Hilfe der *Rehm-Weller*-Gleichung abgeschätzt werden:^[132, 133]

$$\Delta G_{CT} = e[E_{ox} - E_{red}] - E_{00} + C$$

- mit:
- ΔG_{CT} : freie Enthalpie des Ladungstrfers (CT: *charge transfer*)
 - e : Elementarladung
 - E_{ox} : Oxidationspotential des Grundzustands
 - E_{red} : Reduktionspotential des Grundzustands
 - E_{00} : Singulett-Energie des HOMO-LUMO-Übergangs
 - C : Änderung der *Coulomb*-Energie, hier näherungsweise $C = 0$

E_{00} gibt die Energiedifferenz zwischen dem Schwingungsgrundzustand des elektronisch angeregten Zustands und dem Schwingungsgrundzustand des elektronischen Grundzustands wieder. Die Energie dieses 0-0-Übergangs kann einfach aus den spektroskopischen Daten entnommen werden, indem man die Lichtenergie am Schnittpunkt von Absorptions- und Fluoreszenzspektrum bestimmt. Der Coulomb-Term ist meist vernachlässigbar und wird gleich null gesetzt.

Abhängig vom jeweiligen Ladungstransfer gilt für die Potentiale des angeregten Zustands des Donors (Do):

$$E_{red}^*(Do) = E_{red}(Do) + E_{00} \quad \text{für den oxidativen Lochtransfer}$$

$$E_{ox}^*(Do) = E_{ox}(Do) - E_{00} \quad \text{für den reduktiven Elektronentransfer}$$

Unter Verwendung dieser beiden Gleichungen ergeben sich für die *Rehm-Weller*-Abschätzung folgende Gleichungen:

$$\Delta G_{HT} = e[E_{ox}(Ak) - E_{red}^*(Do)]$$

$$\Delta G_{ET} = e[E_{ox}^*(Do) - E_{red}(Ak)]$$

Es gibt verschiedene Möglichkeiten um Ladungstransferprozesse nachzuweisen. Die elektrochemische Detektion^[83, 134], spektroskopische Detektion^[135, 136] oder die Analyse irreversibler DNA-Folgeprodukte^[137-141], wie z.B. Strangbrüche, werden dazu am häufigsten verwendet. Im Rahmen dieser Arbeit werden ausschließlich spektroskopische Methoden verwendet. Die transiente Absorptionsspektroskopie und die Fluoreszenzlöschung durch Ladungstransferprozesse werden im Folgenden kurz erläutert.

3.3.3.1 Untersuchung von Ladungstransferprozessen mittels transienter Absorption

Mittels Transientenabsorptionsspektroskopie ist es möglich, die Absorption von kurzlebigen Spezies bis hin zu einer Auflösung im fs-Bereich zu detektieren. Dabei können sowohl Absorptions- als auch Relaxationsprozesse zeitabhängig verfolgt werden. Durch einen kurzen Laserpuls wird ein Teil der Moleküle in der zu untersuchenden Probe elektronisch angeregt (*pump*, Abb. 25). Je nach Experiment sind dies typischerweise zwischen 0.1 % und mehreren 10 %.^[142] Danach wird mit bestimmten zeitlichen Verzögerungen τ ein schwacher Abfragepuls (*probe*) durch die Probe gestrahlt.

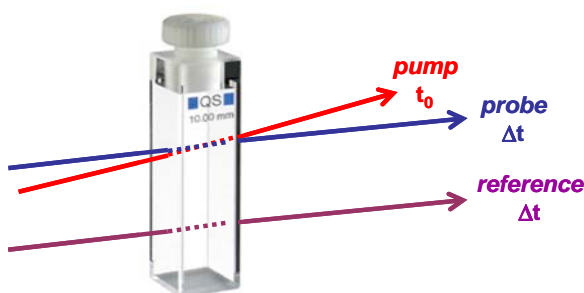


Abb. 25: Schematische Darstellung einer zeitaufgelösten Transientenabsorptions-Messung.

Die Absorptionsänderungen ΔA werden aus der Differenz des Absorptionsspektrums der angeregten Probe und der Probe im Grundzustand berechnet. Nimmt man ΔA bei verschiedenen Verzögerungszeiten τ auf, so ist ΔA abhängig von τ und der Wellenlänge λ . $\Delta A(\tau, \lambda)$ enthält Informationen über dynamische Prozesse, die nach der Anregung ablaufen, wie z.B. Lebenszeiten des angeregten Zustands, ISC oder Elektronen- oder Protonentransferprozesse.

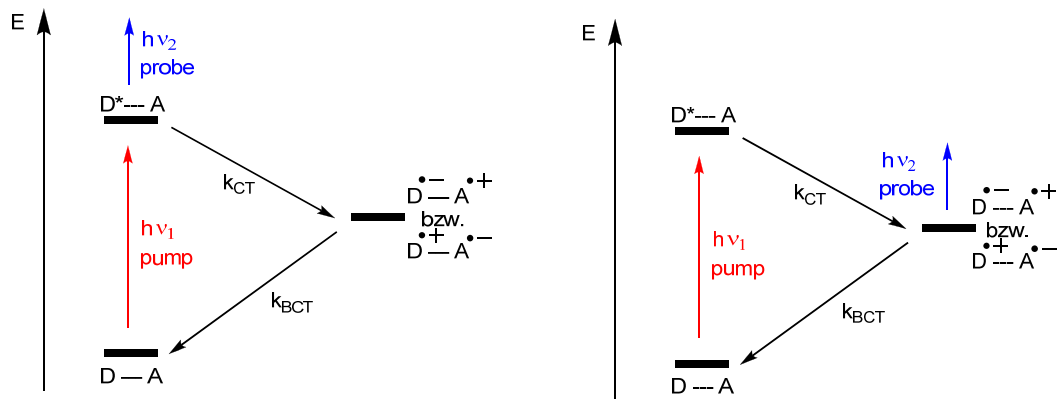


Abb. 26: Anregung des Ladungsdonors D und Abfrage beliebiger Zustände durch Transientenabsorptionsspektroskopie; k_{CT} : Ladungstransferrate, k_{BCT} : Rücktransferrate

Generell tragen verschiedene Faktoren zu einem ΔA Spektrum bei:^[142]

- Bleichen des Grundzustands
Durch die Anregung einiger Moleküle nimmt die Zahl der Moleküle im Grundzustand ab. Dies führt dazu, dass die Grundzustandsabsorption in der angeregten Probe geringer ist als in der nicht angeregten Probe. Man erhält also ein negatives Signal im ΔA Spektrum.
- Stimulierte Emission
Für ein System mit zwei Zuständen sind die Einsteinkoeffizienten für Absorption aus den Grundzustand (A_{12}) und stimulierte Emission aus dem angeregten Zustand (A_{21}) identisch. Das bedeutet, dass es durch den Abfragepuls auch zu stimulierter Emission aus dem besetzten angeregten Zustand heraus kommt. Diese stimulierte Emission erhöht die Lichtintensität am Detektor und führt zu einem negativen Signal im ΔA -Spektrum.
- Absorption des angeregten Zustands
Durch den Abfragepuls können Moleküle aus einem angeregten Zustand in einen höher angeregten Zustand übergehen. Dabei werden sie bestimmte

Wellenlängen des Abfragepulses absorbieren. Dies führt dazu, dass weniger Licht am Detektor auftrifft und zu einem positiven Signal im ΔA -Spektrum.

- **Produktaborption**

Nach der Anregung (*pump*) eröffnen sich den angeregten Molekülen neue Reaktionswege. Diese können zu transienten oder langlebigen Zuständen, wie z.B. Triplett-Zustände oder ladungsgetrennte Zustände führen. Die Absorptionen dieser „Produkt-Zustände“ tragen ebenfalls durch ein positives Signal zum ΔA -Spektrum bei.

3.3.3.2 Untersuchung von Ladungstransferprozessen durch Fluoreszenzlöschung

Photoinduzierte Ladungstransferreaktionen können sowohl intramolekular als auch intermolekular stattfinden. Dabei kommt es jeweils zur Ausbildung eines nicht-strahlenden ladungsgetrennten Zustands.

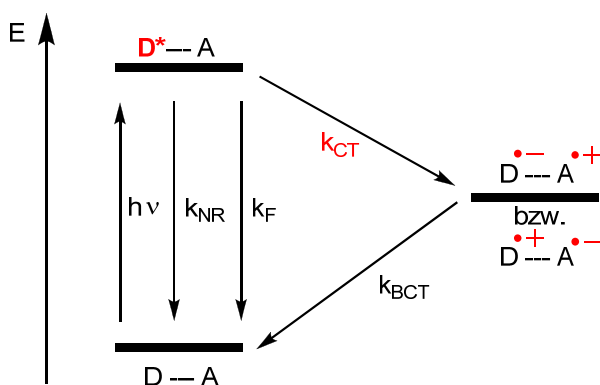


Abb. 27: Fluoreszenzlöschung durch photoinduzierte Ladungstransferprozesse; k_F : Ratenkonstante der Fluoreszenzemission, k_{NR} : Summe aller strahlungslosen Übergänge, k_{CT} : Ratenkonstante des Ladungstransfers, k_{BCT} : Ratenkonstante der Ladungsrekombination.

Durch den zusätzlichen strahlungslosen Relaxationsweg nehmen die Fluoreszenzlebenszeiten τ_F und die Quantenausbeuten Φ_F des Donor-Fluorophors ab und es kommt zu einer Fluoreszenzlöschung. Die Änderung der Quantenausbeute lässt sich mit Hilfe der Ratenkonstanten wie folgt ausdrücken:

$$\Phi_F = \frac{k_F}{\sum k_{NR} + k_F + k_{CT}}$$

Je größer die Ratenkonstante des Ladungstransfers ist, desto stärker wird die Donor-Emission gelöscht. Wie bereits in Kapitel 3.3.1 erwähnt, ist k_{CT} von diversen Faktoren, wie der elektronischen Kopplung und dem Abstand zwischen Ladungsdonor und -akzeptor, sowie der Triebkraft ΔG für den Ladungstransfer abhängig. Um die Ladungstransferraten für ein bestimmtes System experimentell zu bestimmen, müssen die unterschiedlichen Fluoreszenzlebenszeiten τ des fluoreszenten Ladungsdonors in Abwesenheit und in Anwesenheit des Ladungsakzeptors bestimmt werden. Daraus lässt sich dann k_{CT} folgendermaßen berechnen:

$$k_{CT} = \frac{1}{\tau_F} - \frac{1}{\tau_{F0}}$$

mit: τ_F : Fluoreszenzlebenszeit des Donors in Anwesenheit des Akzeptors
 τ_{F0} : Fluoreszenzlebenszeit des Donors in Abwesenheit des Akzeptors

3.3.3.3 Studien zum oxidativen Lochtransfer

Eine Zusammenfassung wichtiger spektroskopischer Studien zum oxidativen Ladungstransfer, sowie der daraus erhaltenen Werte für β und k_{CT} gibt Tabelle 1.

Tabelle 1: Übersicht wichtiger Experimente zum oxidativen Ladungstransfer in DNA.

Ladungsdonor-/akzeptor	$\beta [\text{\AA}^{-1}]$	$k_{CT} [\text{s}^{-1}]$	Arbeitsgruppe	Jahr
Et / MV	-	10^5	Fromherz ^[143]	1986
Et / MV, Ac / DAP	1,0	10^8	Harriman ^[144]	1992
Ru(II)/ Rh(III) Komplexe	0,2	10^9	Barton ^[77, 145-147]	1993
Ru(II)/ Rh(III) Komplexe	1,0 - 1,5	10^6	Meade ^[148]	1995
St/ G	0,64	$10^8 - 10^{12}$	Lewis/Wasielewski ^[126]	1997
Et / Rh(III) Komplex	-	10^{10}	Barton ^[124]	1997
Ac/ G	1,4	$10^5 - 10^{10}$	Tanaka ^[149]	1998
Rf/ GG	-	-	Saito ^[150-152]	1998
Et/ Z	-	10^{12}	Barton/Zewail ^[115]	1999
Ap/ G	0,1 – 1,0	$10^9 - 10^{10}$	Barton/Zewail ^[12, 125]	1999
AQ/ GG, AQ/ OxoG	-	-	Schuster ^[153]	1999
Ap/ G	0,75	$10^6 - 10^7$	Shafirovich ^[154]	2000
Ap/ G	0,6	$10^9 - 10^{11}$	Barton/Zewail ^[125]	2000
AQ/ GG	-	-	Schuster ^[155]	2000
Ac/ G, Ac/ Z	0,8 – 2,0	$10^7 - 10^{12}$	Michel-Beyerle ^[156]	2001
Py/ G, Ptz/ G	0,2 – 0,3	10^4	Majima/Kawai ^[157]	2002
^{CNBP} U/ ^{Ph} G	-	-	Saito ^[158]	2002
Ru(II) Komplex/ Me-In	-	$\geq 10^7$	Barton ^[159]	2002
AQ/ ^{CP} A	-	-	Saito ^[117]	2003
Ap/ G, Ap/ ^{CP} G	-	-	Barton ^[114]	2004
AQ/ GG	-	-	Schuster ^[160]	2004
Rh(III) Komplex/ ^{CP} C, AQ/ ^{CP} C	-	-	Barton ^[161]	2004
St/ Sto	0,4	10^8	Lewis/Wasielewski ^[162]	2004
Sa/ Sd	-	-	Lewis/Fiebig/Shafirovich ^[85]	2006
Et/ Z	0,4	$10^{10} - 10^{11}$	Fiebig/Wagenknecht ^[163]	2006
AQ/G, NI/G, NDI/G	-	-	Majima ^[164]	2010

Abkürzungen: **Ac** = Acridin, **Ap** = 2-Aminopurin, **AQ** = Anthrachinon, ^{CP}**A** = *N*²-Cyclopropyladenin, ^{CP}**C** = *N*²-Cyclopropylcytosin, **DAP** = *N,N*-Dimethyl-2,7-diazapyren, **Et** = Ethidium, **G** = Guanin, ^{CP}**G** = *N*²-Cyclopropylguanin, ^{Ph}**G** = *N*²-Phenylguanosin, **Me-In** = 4-Methylindol, **NI** = Naphthalimid, **NDI** = Naphthalidiimid, **OxoG** = 7,8-Dihydro-8-oxoguanin, **Ptz** = Phenothiazin, **Py** = Pyren, **Sa** = Stilbendicarboxamid, **Sd** = Stilbendiether, **St** = Stilbendicarboxamid, **Sto** = Stilbenether, ^{CNBP}**U** = Cyanobenzophenon-substituiertes Uridin, **Z** = 7-Deazaguanin.

3.3.3.4 Studien zum reduktiven Elektronentransfer

Erste Erkenntnisse zum reduktiven Elektronentransfer wurden aus γ -Puls-Radiolyse-Studien durch *Sevilla* und *Anderson* gewonnen.^[165-173] Durch Einwirkung von γ -Strahlung auf die Proben, wurden solvatisierte Elektronen erzeugt, die in der Lage sind, DNA zu reduzieren. Als Elektronenakzeptoren wurden polykondensierte Aromaten, Acridine und Chinoline verwendet, die an zufälligen Stellen in native DNA interkalieren. Mittels ESR-Spektroskopie wurde die Abnahme der Signalintensität des primär entstehenden Nukleobasenradikalanions und die Zunahme des Signals des durch Ladungstransfer entstehenden Interkalatorradikals verfolgt. Der Nachteil dieses Experiments besteht darin, dass weder die Elektroneninjektion noch das Abfangen der Ladung an definierten Stellen erfolgen können. Daher sind Aussagen über den Mechanismus des reduktiven Ladungstrfers nur sehr eingeschränkt möglich.

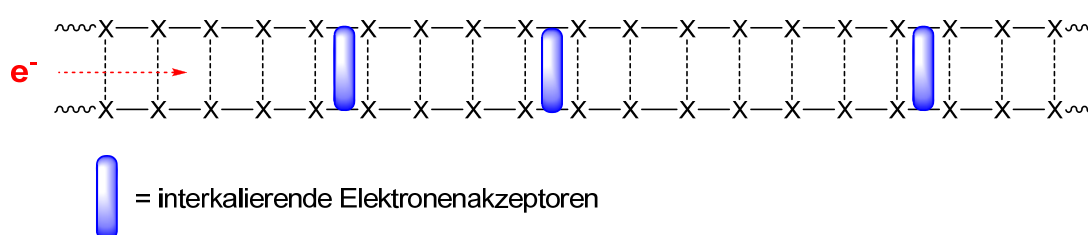


Abb. 28: Schematische Darstellung eines typischen γ -Puls-Radiolyse-Experiments mit interkalierenden Elektronenakzeptoren.

Ergebnisse aus Tieftemperaturmessungen DNA-haltiger Gläser deuten auf einen Tunnelprozess nach dem Superaustausch-Mechanismus hin.^[165-168] Der β -Wert liegt zwischen $\beta = 0.8$ und $\beta = 1.2 \text{ \AA}^{-1}$. Dies deckt sich mit theoretischen Berechnungen und liegt im Bereich der Leitfähigkeit von Proteinen. In Lösung bzw. bei höherer Temperatur wird aufgrund der gemessenen Transferraten und Reichweiten angenommen, dass der Elektronentransfer nach dem *Hopping*-Mechanismus verläuft.

Zur weiteren Erforschung von Elektroneninjektion und reduktivem Elektronentransfer wurden Flavin (FI),^[137, 138] Naphthalendiamin (Nd),^[139, 174] Stilbendiether (SbE),^[175] das Thyminderivat Tx,^[176, 177] Phenothiazin-dU (PtzdU)^[140] und die pyrenmodifizierten Uridine 1PydU^[178, 179] und 2PydU^[180] als photoanregbare Elektronendonoren kovalent an Oligonukleotide gebunden. Die Redox Eigenschaften

der Chromophore unterscheiden sich sehr deutlich. Eine Übersicht gibt Abb. 29. Während **FI** und **Nd** im angeregten Zustand in der Lage sind, alle natürlichen Nukleobasen außer G zu reduzieren, können **SbE**, **Tx**, **PtzdU**, **1PydU** und **2PydU** Elektronen nur auf die Pyrimidinbasen C und T übertragen.

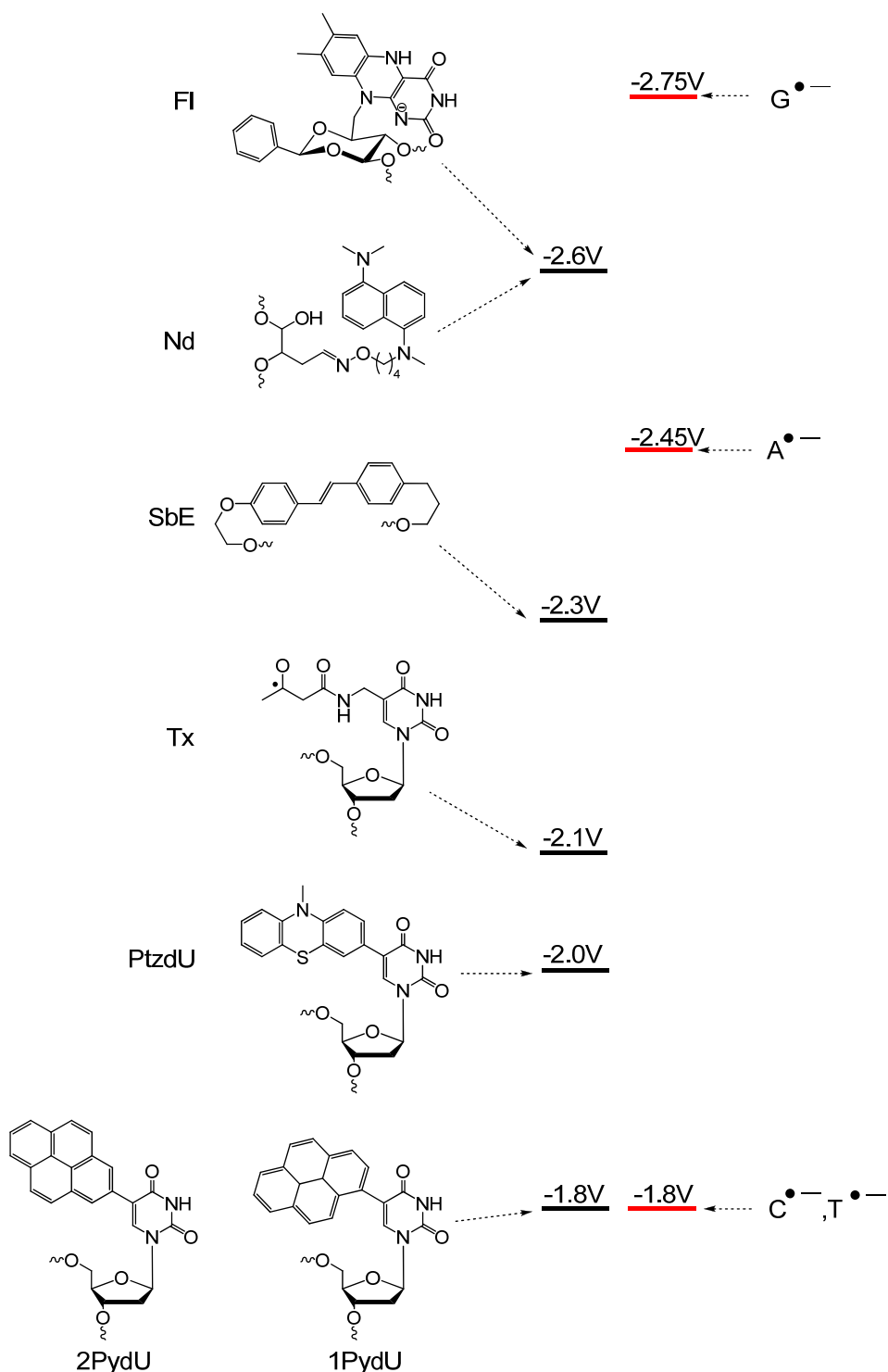


Abb. 29: Übersicht über verschiedene Ladungsinjektoren zur Auslösung des reduktiven Elektronentransfers in DNA.

3.3.3.5 Biologische Relevanz des Ladungstransfers

Radikalische Ladungsträger in der DNA können, wenn sie nicht rechtzeitig repariert werden, zu Schädigungen des Erbgutes führen. Solche Radikale können durch unterschiedliche Umwelteinflüsse, wie Röntgen- oder UV-Strahlen, Sauerstoff- und organische Radikale, erzeugt werden.^[81] Dabei ist die Stelle der Ladungsinjektion nicht zwangsläufig identisch mit der Stelle, an der der DNA-Schaden auftritt, da die radikalische Ladung entlang des Basenstapels wandern kann. Ein wichtiges Intermediat bei radikalischen DNA-Schädigungen ist das Guaninradikalkation $G^{\bullet+}$, dass aufgrund der leichten Oxidierbarkeit des Guanins häufig auftritt. Durch Reaktionen mit Wasser oder Sauerstoff kommt es zur Bildung von oxidativen Guaninschäden (G^{ox}).^[56, 128]

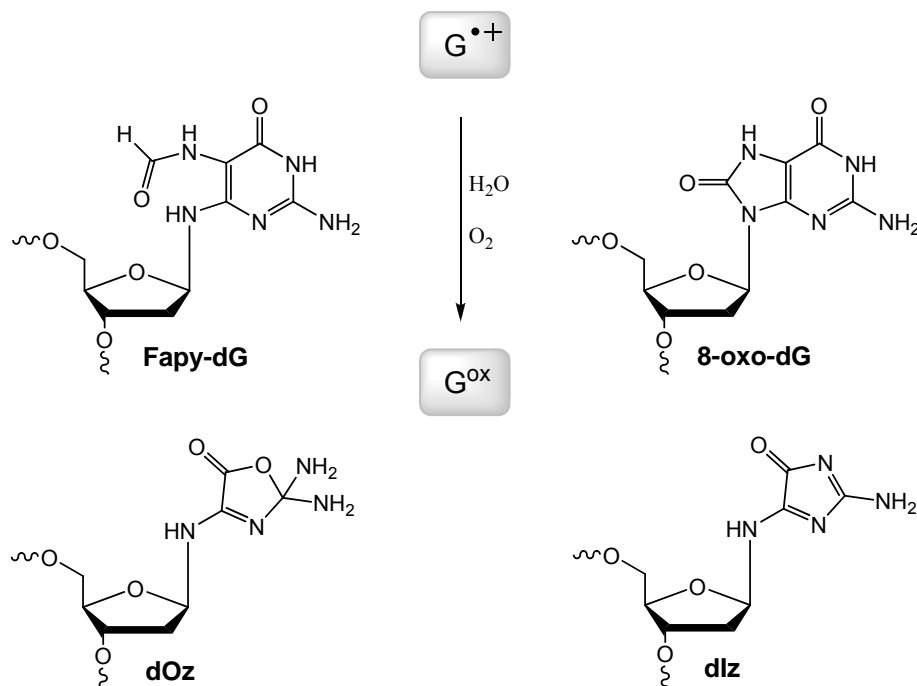


Abb. 30: Übersicht über die wichtigsten Oxidationsprodukte des Guanins (G^{ox}). Fapy-dG: 2,6-Diamino-4-hydroxy-5-formamidopyrimidin, 8-oxo-dG: 8-Oxo-7,8-dihydroguanin, dOz: Oxazolone, dlz: Imidazolone.^[56, 128, 181]

Wie es zu einer Erbgutschädigung durch Guaninoxidationsprodukte kommen kann, soll hier kurz am Beispiel des 8-oxo-dG erläutert werden.^[82] Im 8-oxo-dG ist das Konformationsgleichgewicht zwischen *syn*- und *anti*-Konformation verschoben, wodurch sich ein Gemisch aus *anti*- und *syn*-ständigem 8-oxo-dG ausbildet. Liegt 8-oxo-dG in der *anti*-Konformation vor (wie G), so paart es wie G mit C und es kommt

zu keiner Schädigung. Kommt es allerdings zu einer Konformationsänderung in die *syn*-Form, wird ein *Hoogsteen*-Basenpaar mit A gebildet. Die Mutation bildet sich dann während der nächsten Replikation aus, da das ursprüngliche GC-Paar durch ein AT-Paar ausgetauscht wird.

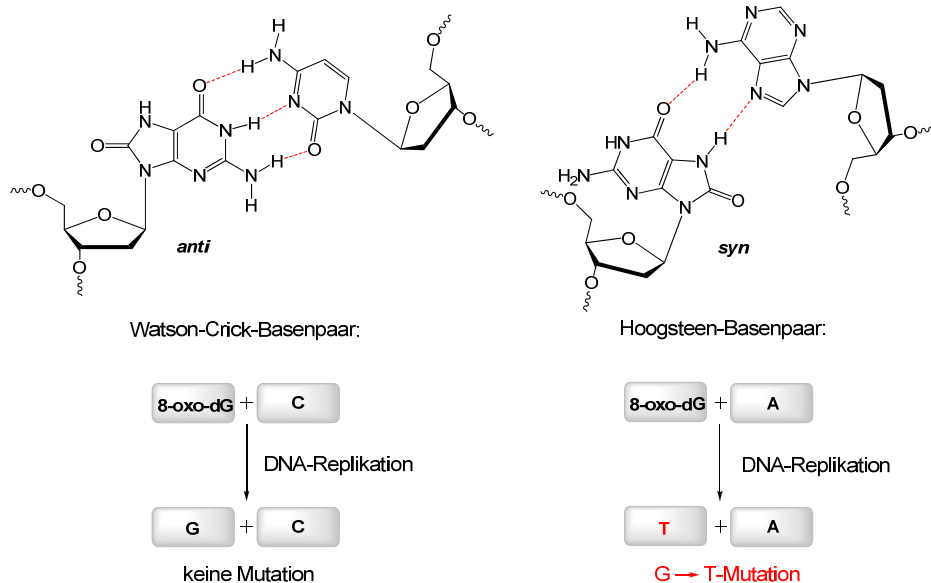


Abb. 31: Schematische Darstellung einer durch G-Oxidation ausgelösten Mutation von GC nach TA.

Weitere DNA-Schäden, die vor allem in Folge von Bestrahlung mit UV B-Licht (280 nm bis 320 nm) auftreten, resultieren aus der photoinduzierten Bildung von Pyrimidindimeren. Diese sind für die Entstehung von Hautkrebs nach intensiver Sonneneinstrahlung verantwortlich. Über eine photochemische [2+2]-Cycloaddition werden Cyclobutan-Pyrimidin-Dimere (CPD), vor allem das T-T-Dimer, gebildet. C-T- und C-C-Dimere treten weniger häufig auf. Durch eine Paternò-Büchi-Reaktion kann auch das sog. 6,4-Photoprodukt entstehen. Solche Photoschäden können durch prokaryontische DNA-Photolyasen bzw. im menschlichen Körper durch Basenexzisions-Reparatur behoben werden.

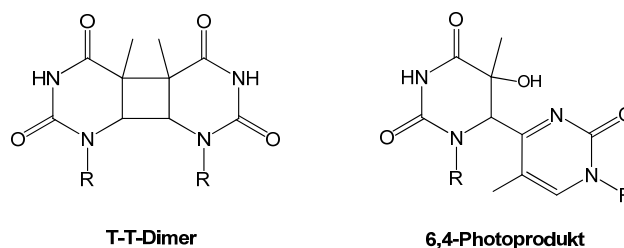


Abb. 32: Folgeprodukte aus Photoreaktionen in der DNA: T-T-Dimer (Cyclobutan-Pyrimidin-Dimer) und das 6,4-Photoprodukt.

4 Neue Fluoreszenzsonden für die DNA-Analytik

Die natürlichen Nukleoside A, C, G und T zeigen bei Raumtemperatur keine intrinsische Fluoreszenz.^[182] Ihre Quantenausbeuten liegen zwischen $0.5 - 3 \times 10^{-4}$ und die zugehörigen Fluoreszenzlebenszeiten liegen im subpicosekunden Bereich.^[183] Für die Natur ist der schnelle Übergang zurück in den Grundzustand essentiell, da so photochemische Reaktionen und Schädigungen minimiert werden.^[184] Für die DNA-Analytik bedeutet dies aber in Umkehrschluss, dass eine direkte Fluoreszenzdetektion unmarkierter DNA bzw. RNA nicht möglich ist. Es besteht allerdings die Möglichkeit, fluoreszente Sonden in Oligonukleotide einzuführen und deren Fluoreszenzsignale für analytische Zwecke zu verwenden. Dies hat zur Entwicklung einer enormen Anzahl von fluoreszenten DNA-Sonden geführt.^[185] Man unterscheidet grundsätzlich zwischen Sonden, die nicht-kovalent mit der DNA wechselwirken, und kovalent gebundenen Fluoreszenzsonden. Im Rahmen dieser Arbeit wurden ausschließlich kovalent gebundene Sonden verwendet. Die unterschiedlichen Strategien für die Anknüpfung solcher Fluoreszenzsonden wurden bereits in Kapitel 3.2 gezeigt.

Einige wichtige Einsatzgebiete für fluoreszente Sonden in der DNA-Analytik werden im Folgenden kurz erläutert:

- SNP-Detektion (*Single Nucleotid Polymorphism*)

Die Detektion von Einzelbasenfehlpaarungen hat aufgrund der Bedeutung solcher Defekte für die menschliche Gesundheit die Aufmerksamkeit der Forschung erregt. Letztlich liegt hier auch der Schlüssel für die Entwicklung einer personalisierten Medizin.^[186, 187] Für die SNP- Detektion werden fluoreszente Oligonukleotide mit der Zielsequenz hybridisiert. Man erhält je nach dem, ob eine Fehlpaarung vorliegt oder nicht ein unterschiedliches Fluoreszenzsignal. In diesem Bereich kommen beispielsweise sog. basendiskriminierende Nukleoside oder *Molecular Beacons* zum Einsatz.^[188-191]

- Aufklärung von Struktur und Funktion von Nukleinsäuren

Nukleinsäuren können je nach zellulärer Funktion in unterschiedlichen Faltungen und aggregierten Zuständen vorliegen.^[192] Durch das Einbringen

entsprechender Sonden in Nukleinsäurestränge kann deren Hybridisierung, Faltung oder konformationelle Veränderung photophysikalisch verfolgt werden.

- Veränderungen der Mikroumgebung

Nukleinsäuren sind ständig reversiblen oder irreversiblen Störungen unterworfen. Dies können unter anderem Basenschädigungen, Depurinierungen/Depyrimidinierungen oder *Base-Flipping* sein. Da einige Fluorophore sehr sensitiv auf kleine Veränderung in ihrer Mikroumgebung reagieren, können sie zur Untersuchung solcher Effekte eingesetzt werden.

Trotz der großen Bandbreite an verfügbaren fluoreszenten Sonden in der Nukleinsäureanalytik werden auch weiterhin neue Sonden benötigt. Im Rahmen dieser Arbeit sollten zum einen sehr langwellig emittierende Sonden mit großen Stokes-Verschiebungen an DNA geknüpft werden, zum anderen sollte ein Bodipy-Basensurrogat mit großer Helligkeit hergestellt und charakterisiert werden.

4.1 Langwellig emittierende Fluoreszenzsonden mit großen Stokes-Verschiebungen

4.1.1 Hintergrund und Synthese

Fluoreszente Bildgebung von biologischen Proben mit Fluorophoren, die im roten oder nahen Infrarot-Bereich des Spektrums emittieren, gewinnt aufgrund ihrer hohen Sensitivität, guten zeitlichen und räumlichen Auflösung und ihres Potentials für die Mehrkanal-Bildgebung immer mehr an Bedeutung.^[193] Langwellig absorbierende und emittierende Fluorophore haben besonders hohes Anwendungspotential für in vitro und in vivo Markierung in biologischen Proben, da sie sowohl unerwünschte Absorption (etwa durch Gewebe) als auch Hintergrund-Lumineszenz auf ein Minimum reduzieren. Die in dieser Arbeit verwendeten Fluorophore weisen zusätzlich eine große Stokes-Verschiebung zwischen Absorption und Emission von

über 100 nm auf, was sie zu idealen Kandidaten für FRET-Experimente macht. Durch die großen Emissionsverschiebungen kann das Problem der direkten Akzeptoranregung im FRET-Experiment umgangen werden.

Im Rahmen dieser Arbeit sollten die Absorptions- und Emissionseigenschaften dreier verschiedener sog. „Mega-Stokes-Dyes“ in Oligonukleotiden, sowie deren Eignung für DNA-basierte FRET-Systeme untersucht werden. Die dafür verwendeten azidfunktionalisierten Farbstoffe wurden von der Gruppe von *Peter Kele* synthetisiert (vgl. Abb. 33).^[194, 195] Der postsynthetische Einbau in die alkinmodifizierte DNA durch „Klick-Chemie“ erfolgte nach einer in unserer Gruppe etablierten Methode.^[62]

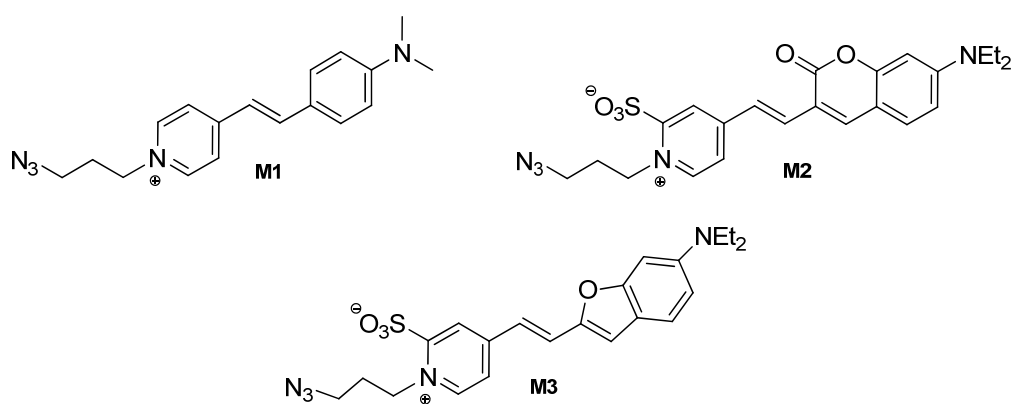


Abb. 33: Strukturen der Farbstoffe **M1-M3**

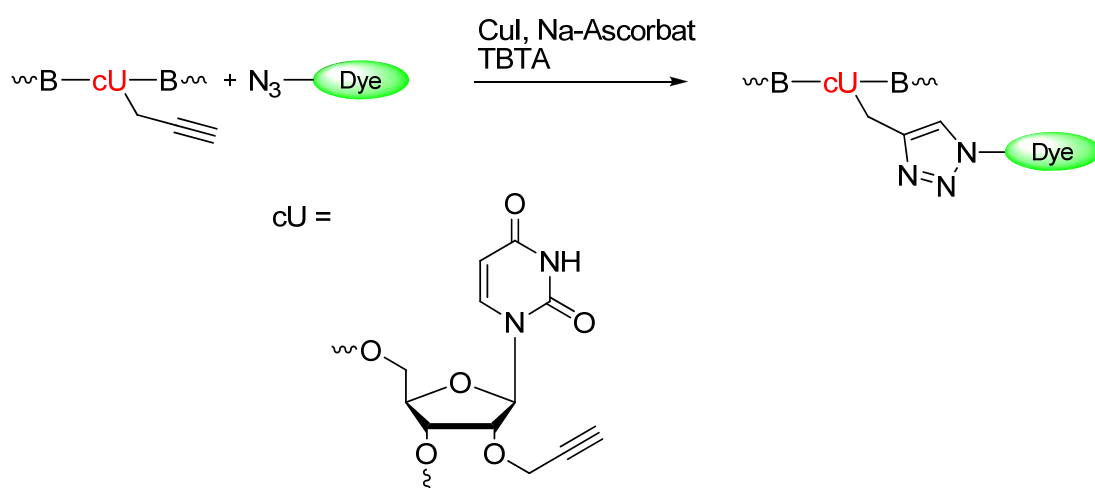


Abb. 34: Schematische Darstellung der „Klick-Reaktion“ eines azidmodifizierten Farbstoffs mit alkinmodifizierter DNA

Die Darstellung des, für die Anknüpfung des Farbstoffs benötigten 2'-OH modifizierten Uridin-Derivates **4**, sowie des entsprechenden Phosphoramidites **6**

erfolgte in vier bzw. sechs Schritten nach einer in unserer Gruppe etablierten Methode.^[196]

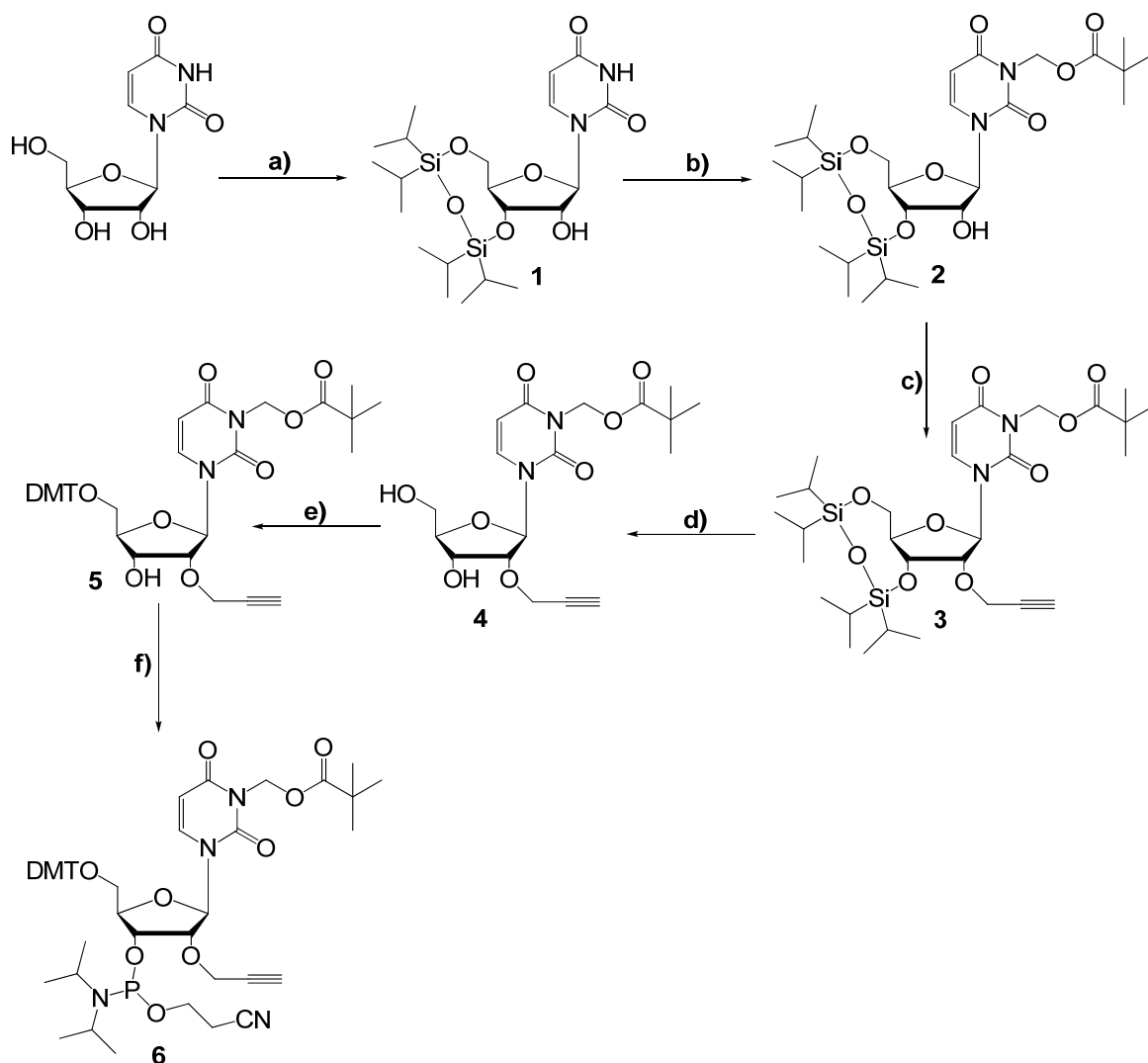


Abb. 35: Darstellung des Phosphoramidit-Bausteins **6** für die postsynthetische Klick-Ligation: **a)** TIPDSiCl₂ (1.1 eq.), abs. Pyridin, 6 h, RT, 86 %; **b)** Pom-Cl (10 eq.), DCM/aq. Na₂CO₃, TBAHS, 48 h, RT, 64 %; **c)** Propargylbromid (1.5 eq.), Phosphazenebase P1-t-Bu (1.5 eq.) in abs. Acetonitril, 15 min bei 0 °C, 90 min bei RT, 72 %; **d)** Et₃N·3HF (3 eq.) in THF, 6 h, RT, 75 % **e)** DMT-Cl (1.3 eq.), abs. Pyridin, 16 h, RT, 84 %; **f)** 2-Cyanoethoxy-*N,N*-diisopropylaminochlorophosphoramidit (2 eq.), DIPEA (3 eq.), abs. DCM, 3 h, RT, 83 %.

In den ersten beiden Stufen werden unter Verwendung von 1,3-Dichloro-1,1,3,3-tetraisopropylidisiloxan selektiv die 3'OH- und 5'OH-Gruppen der Ribose (**1**) und mittels Chloromethylpivalat die N3-Position des Uridins (**2**) geschützt. Anschließend wird unter Verwendung von Propargylbromid und einer Phosphazene-Base die, für die „Klick-Reaktion“ benötigte, Alkin-Gruppe an die 2'OH-Gruppe des Zuckers geknüpft

(3). Es folgen die Entschützung der OH-Gruppen der Ribose durch $\text{NEt}_3 \cdot 3\text{HF}$ (4), sowie die DMT-Schützung der 5'OH-Position des Zuckers (5). Der Phosphoramidit-Baustein 6 wurde durch Umsetzung von 5 mit 2-Cyanoethyl-*N,N*-diisopropylchlorophosphoramidit nach Standardprotokollen dargestellt. Durch eine Überarbeitung der Synthese von 3 konnte die Ausbeute für diesen Schlüsselschritt von 30% auf 72% gesteigert werden.

4.1.2 Untersuchung der Eigenschaften einzelner Sonden in DNA

Die für die Experimente verwendeten Fluorophore sowie deren Verknüpfung mit den Oligonukleotiden und die entsprechenden DNA-Sequenzen sind in Abb. 36 dargestellt:

M1-DNA1 '3—G—C—G—C—T—C—A—A—**M1**—A—T—A—A—T—T—A—T—C—G—G—5'

M2-DNA1 '3—C—C—G—A—T—A—A—T—T—A—T—**M2**—T—T—G—A—G—C—G—C—5'

M3-DNA1 '3—C—C—G—A—T—A—A—T—T—A—T—**M3**—T—T—G—A—G—C—G—C—5'

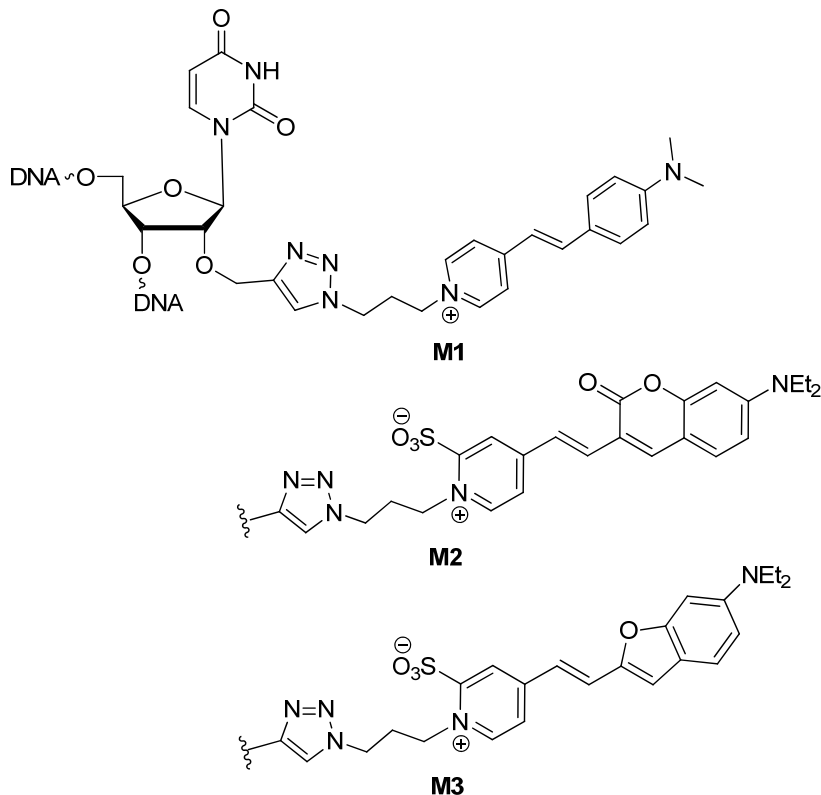


Abb. 36: Oligonukleotidsequenzen und Strukturen der verwendeten Farbstoffe **M1**, **M2** und **M3**

Um das Verhalten der Farbstoffe **M1**, **M2** und **M3** in DNA zu untersuchen, wurden diese zunächst einzeln in Oligonukleotide eingebaut und ihre Absorptions- und Fluoreszenzeigenschaften im Einzelstrang und im Doppelstrang gemessen. Für die Doppelstrang-Experimente wurden jeweils die vollständig komplementären Gegenstränge mit A als Gegenbase zur Modifikationsstelle verwendet. Soweit im Folgenden nicht durch den Zusatz ss (*single stranded*) gekennzeichnet, handelt es sich immer um doppelsträngige Oligonukleotide.

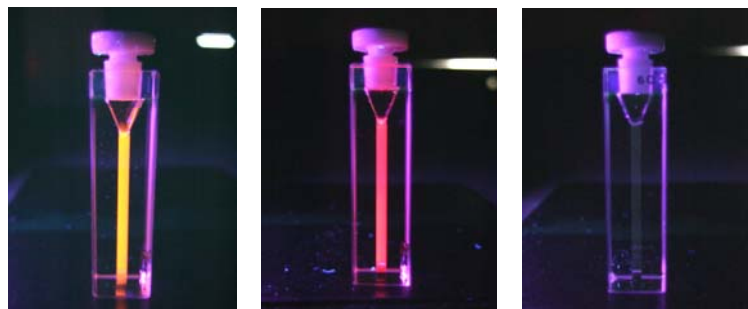


Abb. 37: Fluoreszenz der Oligonukleotid-Duplexe **M1-DNA1**, **M2-DNA1** und **M3-DNA1**

Die **M1**-modifizierten Oligonukleotide zeigen eine charakteristische breite Farbstoffabsorption im Bereich zwischen $\lambda = 400$ nm und $\lambda = 575$ nm. Das Absorptionsmaximum liegt bei $\lambda = 499$ nm (**M1-DNA1ss**) bzw. $\lambda = 503$ nm (**M1-DNA1**) und ist damit gegenüber dem freien Farbstoff in Wasser deutlich rotverschoben ($\lambda_{\text{abs}} = 468$ nm). Dies spricht für eine Änderung in der Polarität der Umgebung durch Wechselwirkung mit der DNA. Die Veränderungen im Absorptionsspektrum durch Hybridisierung des Gegenstranges sind dagegen vernachlässigbar gering (vgl. Abb. 38).

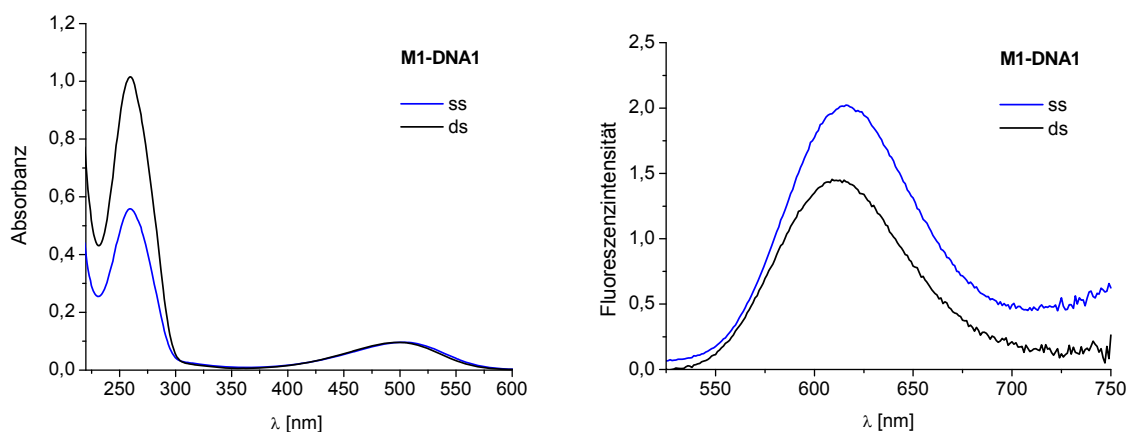


Abb. 38: Absorptions- und Emissionsspektren der **M1**-markierten Oligonukleotide ($\lambda_{\text{ex}} = 500$ nm).

In der Fluoreszenz der **M1**-Oligonukleotide lässt sich eine hypsochrome Verschiebung der Spektren im Vergleich zum freien Farbstoff in PBS-Puffer erkennen. Die Fluoreszenzmaxima liegen bei $\lambda = 616$ nm (**M1-DNA1ss**) bzw. 610 nm (**M1-DNA1**) für die Oligonukleotide und $\lambda = 630$ nm für den freien Farbstoff. Durch Hybridisierung kommt es zu einer moderaten Blauverschiebung (6 nm) und einem leichten Fluoreszenzabfall. Die Quantenausbeuten steigen durch die Anknüpfung von **M1** an DNA von <1% (freier Farbstoff) auf 23% im Doppelstrang an. Die große Stokes-Verschiebung von **M1** bleibt auch in den Oligonukleotiden erhalten.

Anhand der Spektren für die Oligonukleotide **M1-DNA1ss** und **M1-DNA1**, dem Vergleich mit dem freien Farbstoff und der Struktur des Chromophors ist zu vermuten, dass **M1** über den positiv geladenen Stickstoff des Pyridinium-Ringes mit dem Phosphatrückgrat der DNA wechselwirkt und sich das Molekül in entlang der großen Furche der DNA ausrichtet. Die dadurch entstehende Einschränkung der Rotation um die Ethen-Brücke bewirkt den Fluoreszenzanstieg gegenüber dem freien Farbstoff.

In den Spektren der **M2**-markierten Oligonukleotide zeigt sich die Absorptionsbande des Farbstoffs zwischen $\lambda = 450$ nm und 650 nm. Die Absorptionsmaxima liegen bei 556 nm (**M2-DNA1ss**) und 550 nm (**M2-DNA1**) und sind verglichen mit **M2** in Wasser ($\lambda_{\text{max}} = 530$ nm) um 26 nm bzw. 20 nm rotverschoben. Durch Hybridisierung kommt es zu einer deutlichen Veränderung des Absorptionsspektrums, was sich durch eine Versteifung der DNA-Struktur und eine dadurch bedingte Änderung der Molekülgeometrie erklären lässt.

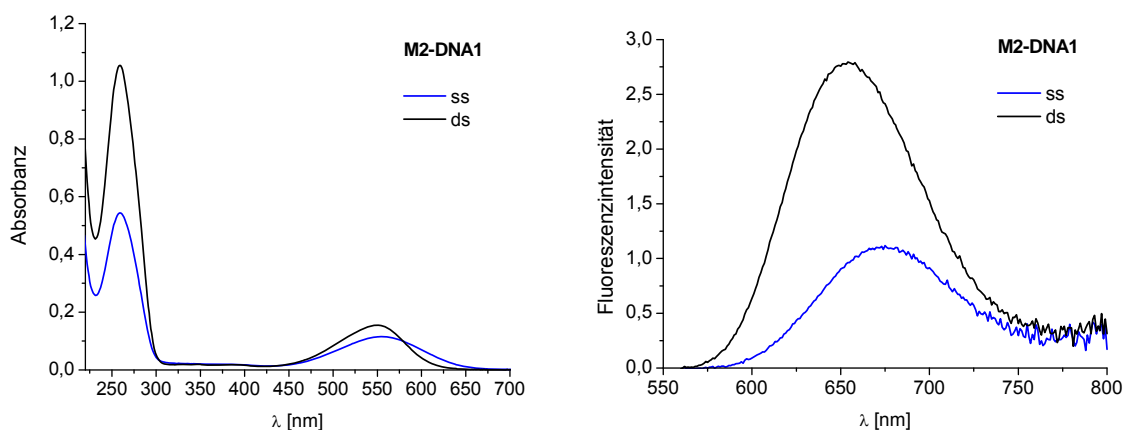


Abb. 39: Absorptions- und Emissionsspektren der **M2**-markierten Oligonukleotide ($\lambda_{\text{ex}} = 550$ nm).

Anhand der Fluoreszenzspektren lässt sich eine deutliche hypsochrome Verschiebung der Emission des Doppelstranges ($\lambda_{\text{max}} = 652 \text{ nm}$) gegenüber dem Einzelstrang ($\lambda_{\text{max}} = 675 \text{ nm}$) erkennen. Die Emission steigt durch Ausbildung der Duplexstruktur deutlich an. Verglichen mit der Emission von **M2** in PBS-Puffer nimmt die Quantenausbeute durch Anknüpfung an Oligonukleotide stark zu. So beträgt Φ_F für den freien Farbstoff **M2** 0.01 und für **M2-DNA1** 0.33. Die große Stokes-Verschiebung zwischen Absorption und Emission wird durch die Verknüpfung mit Oligonukleotiden kaum beeinflusst.

Anhand dieser Ergebnisse und der Struktur von **M2** liegt die Vermutung nahe, dass **M2** in einer der Furchen der DNA koordiniert wird. Dabei wird die Orientierung in einer Weise erfolgen, dass die Pyridinium-Gruppe von **M2** elektrostatisch mit dem Phosphatrückgrat der DNA wechselwirkt, gleichzeitig aber auch die repulsiven Wechselwirkungen der Sulfonat-Gruppe mit den Phosphatbrücken minimiert werden. Der Anstieg der Quantenausbeuten vom freien Farbstoff über **M2-DNA1ss** hin zu **M2-DNA1** lässt sich durch eine verlangsamte Rotation um die Ethen-Brücke und die Abschirmung des Fluorophors gegenüber Wassermolekülen erklären.

Die Absorptionsbande des **M3**-Chromophors in den Oligonukleotiden **M3-DNA1ss** und **M3-DNA1** erstreckt sich von etwa $\lambda = 500 \text{ nm}$ bis 750 nm (vgl. Abb. 40). Der freie Farbstoff zeigt in Wasser ein Absorptionsmaximum bei 568 nm , welches in den Oligonukleotiden mit 615 nm (**M3-DNA1ss**) bzw. 622 nm (**M3-DNA1**) deutlich bathochrom verschoben ist. Die leichte Rotverschiebung im Doppelstrang gegenüber dem Einzelstrang lässt sich durch eine Verringerung der Polarität in der unmittelbaren Umgebung des Farbstoff-Moleküls erklären.

Im Emissionsspektrum lassen sich keine nennenswerten Unterschiede zwischen **M3-DNA1ss** und **M3-DNA1** feststellen. Die Emissionsmaxima liegen bei $\lambda_{\text{max}} = 752 \text{ nm}$ (ss) bzw. 751 nm (ds). Die Emission von **M3** in PBS-Puffer ist gegenüber der der Oligonukleotide leicht blauverschoben ($\lambda_{\text{max}} = 744 \text{ nm}$). Die Quantenausbeute nimmt zwar durch die Anknüpfung an DNA deutlich zu, bleibt allerdings dennoch mit ca. 0.01 recht gering.

Die Gründe für den Emissionsanstieg von **M3** durch Anknüpfung an Oligonukleotide entsprechen im Wesentlichen den bereits für **M2** erläuterten.

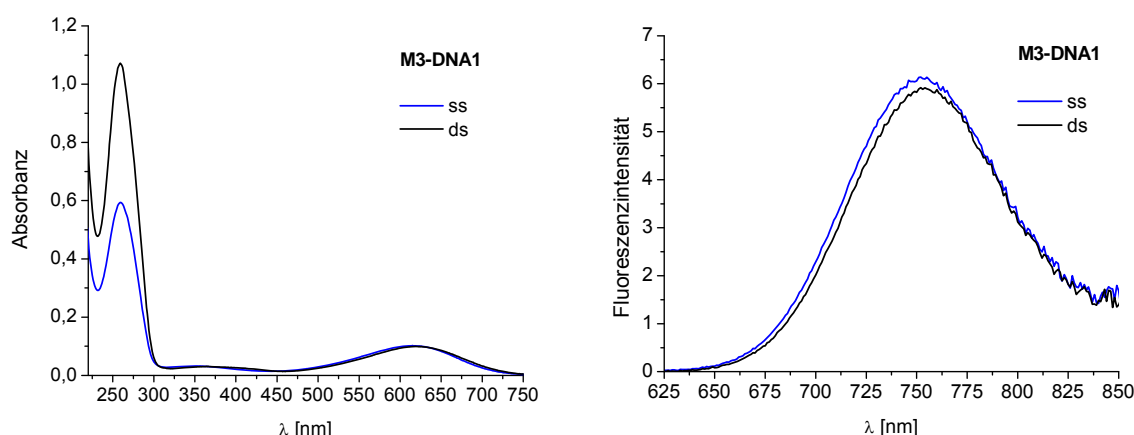


Abb. 40: Absorptions- und Emissionsspektren der **M3**-markierten Oligonukleotide ($\lambda_{\text{ex}} = 615 \text{ nm}$).

Eine Übersicht der spektroskopischen Eigenschaften der einzelnen Oligonukleotide, sowie der Schmelztemperaturen der untersuchten Duplexe ist in Tabelle 2 zusammengestellt. Die ermittelten Schmelztemperaturen für **M1-DNA1**, **M2-DNA1** und **M3-DNA1** unterscheiden sich dabei nur unwesentlich von der des entsprechenden unmodifizierten Duplexes ($T_m = 65.0^\circ\text{C}$). Dies zeigt, dass die Störung durch das Uridin-Fluorophor-Konjugat gering ist und die Basenpaarung zwischen U und A erhalten bleibt.

Tabelle 2: Zusammenfassung der spektroskopischen Eigenschaften und Schmelztemperaturen

DNA	$\lambda_{\text{abs}}[\text{nm}]$	$\lambda_{\text{em}}[\text{nm}]$	$\Delta\lambda[\text{nm}]$	$\epsilon[\text{mol L}^{-1} \text{ cm}^{-1}]$	Φ_F	$T_m[^\circ\text{C}]$
M1-DNA1ss	503	616	113	38600		
M1-DNA1	499	610	111	38200	0.23	64.3
M2-DNA1ss	556	675	119	49400		
M2-DNA1	550	652	102	62000	0.33	64.5
M3-DNA1ss	615	752	137	40400		
M3-DNA1	622	751	129	39600	>0.01	65.0

Um die im nächsten Abschnitt dargestellten FRET Experimente besser deuten zu können ist es wichtig, sich die Temperaturabhängigkeit der Fluoreszenz für die modifizierten DNA-Duplexe anzusehen (Abb. 41). Für **M1-DNA1** und **M3-DNA1** lässt sich die erwartete Verringerung der Fluoreszenz und eine leichte Rotverschiebung der Emission durch Temperaturerhöhung feststellen. Im Falle von **M2-DNA1** wird dieser Effekt im Bereich der Schmelztemperatur durch Dehybridisierung des Duplexes verstärkt.

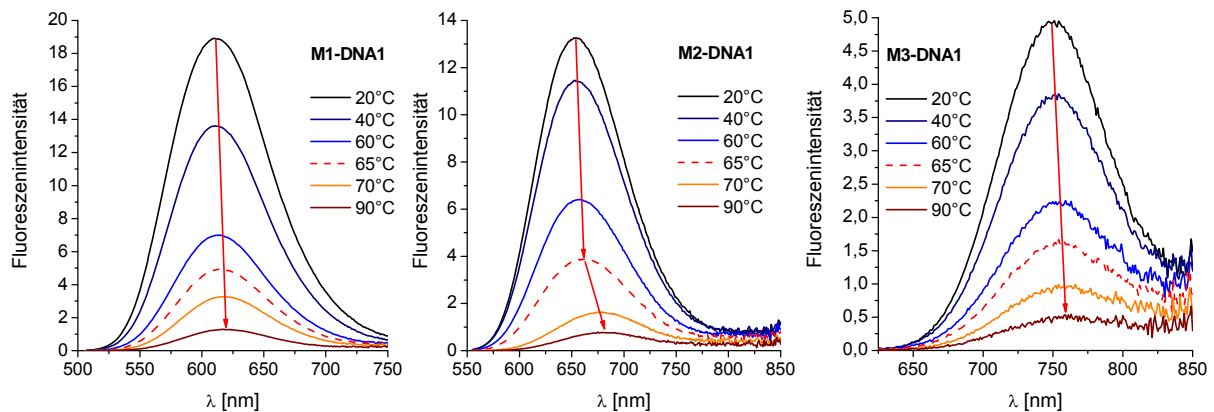


Abb. 41: Temperaturabhängige Fluoreszenzmessungen der Oligonukleotide **M1-DNA1**, **M2-DNA1** und **M3-DNA1**.

4.1.3 Untersuchungen zum FRET

Um den Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer zwischen **M1** als Fluoreszenzdonor und **M2** bzw. **M3** als Fluoreszenzakzeptoren zu untersuchen wurden Duplexe mit unterschiedlichen Anordnungen der Farbstoffe synthetisiert (Abb. 42). Dabei gilt es zu beachten, dass bei einer Anordnung der Farbstoffe direkt gegenüber an dieser Stelle die Basenpaarung verloren geht.

M1-DNA1 '3—G—C—G—C—T—C—A—A—**M1**—A—T—A—A—T—T—A—T—C—G—G—5'

M2/3-DNA1 '5—C—G—C—G—A—G—T—T—**M2/3**—T—A—T—T—A—A—T—A—G—C—C—3'

M2/3-DNA2 '5—C—G—C—G—A—G—T—T—A—**M2/3**—A—T—T—A—A—T—A—G—C—C—3'

M2/3-DNA3 '5—C—G—C—G—A—G—T—T—A—T—A—A—**M2/3**—A—A—T—A—G—C—C—3'

Abb. 42: Oligonukleotidsequenzen zur Untersuchung des FRET zwischen **M1** und **M2** bzw. **M3**

Zunächst wurden das Absorptions- und Fluoreszenzverhalten von Oligonukleotid-Duplexen untersucht, welche **M1** und **M2** enthielten (Abb. 43). Das Absorptionsspektrum der Duplexe **M1-DNA1/M2-DNA1** bzw. **M1-DNA1/M2-DNA2**, in denen die Farbstoffe gegenüber bzw. benachbart in den jeweiligen komplementären Oligonukleotiden platziert sind, kommt im Wesentlichen durch eine additive Überlagerung der Absorptionen der einzelnen Farbstoffe zustande. Das Maximum

der Absorption liegt bei $\lambda = 520$ nm. Beim Absorptionsverhalten von **M1-DNA1/M2-DNA3** scheinen zusätzlich noch Wechselwirkungen eines bzw. beider Farbstoffe mit der DNA oder der Chromophore untereinander eine Rolle zu spielen. Dadurch wird die Form der Absorptionsbande verändert und das Maximum auf $\lambda_{\text{max}} = 529$ nm verschoben.

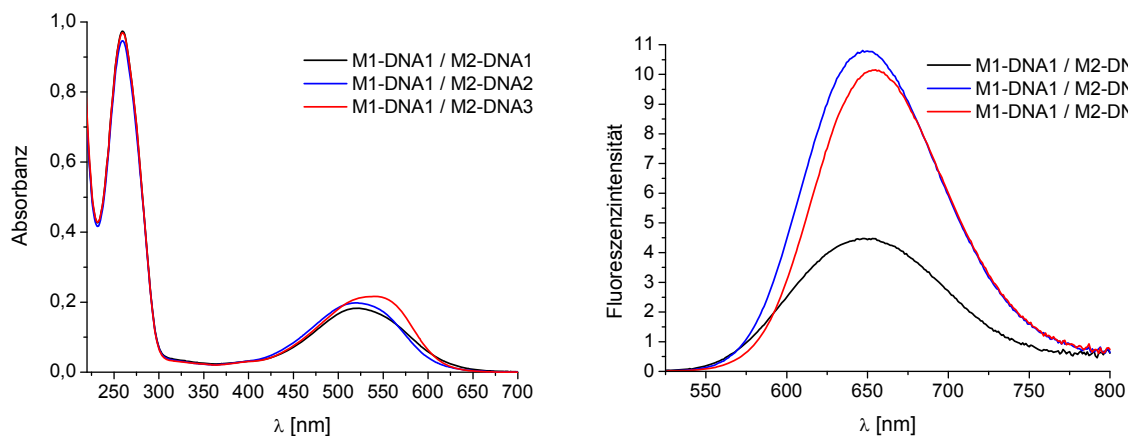


Abb. 43: Absorptions- und Emissionseigenschaften der **M1/M2** FRET-Duplexe ($\lambda_{\text{ex}} = 450$ nm).

In allen drei **M1/M2** FRET-Systemen zeigt sich, dass die Emission im Wesentlichen durch die Fluoreszenzeigenschaften von **M2** bestimmt wird. Die Emissionsmaxima liegen zwischen 650 nm und 655 nm und stimmen in allen Fällen bis auf wenige nm mit denen von **M2-DNA1** überein. Die Intensitätsunterschiede zwischen **M1-DNA1/M2-DNA1** und den anderen beiden Oligonukleotiden lassen sich auf die fehlende Basenpaarung und die damit verbundene weniger rigide Struktur, nicht aber auf Unterschiede in der FRET-Effizienz zurückführen. Die Fluoreszenzspektren unterscheiden sich aber auch in der Lage der kurzwelligen Flanke der Emission, diese wird von **M1-DNA1/M2-DNA1** über **M1-DNA1/M2-DNA2** hin zu **M1-DNA1/M2-DNA3** immer weiter rotverschoben (Abb. 44). Das bedeutet, dass der Anteil der Donoremission in dieser Reihe immer weiter abnimmt. Gleichzeitig nimmt die FRET-Effizienz zu. Im Falle von **M1-DNA1/M2-DNA3** liegt die Emissionsbande beinahe deckungsgleich mit der von **M2-DNA1**, was bedeutet, dass nur der FRET-Akzeptor, nicht aber der Donor emittiert. Der Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer verläuft demnach nahezu quantitativ.

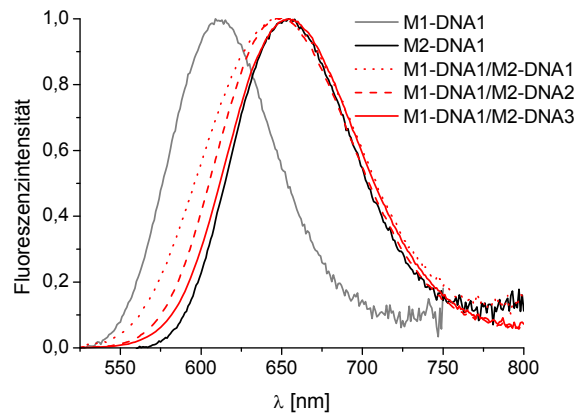


Abb. 44: Normierte Emissionsspektren von **M1-DNA1**, **M2-DNA1**, sowie der **M1/M2** FRET-Systeme

In Tabelle 3 sind die wichtigsten spektroskopischen Daten, sowie die Schmelztemperaturen der **M1/M2** FRET-Systeme zusammengestellt:

Tabelle 3: Übersicht über die spektroskopischen Daten und T_m -Werte der **M1/M2** FRET-Systeme

DNA	$\lambda_{\text{abs}}[\text{nm}]$	$\lambda_{\text{em}} [\text{nm}]$	$\Delta\lambda [\text{nm}]$	Φ_F	$T_m [^\circ\text{C}]$
M1-DNA1/M2-DNA1	520	650	130	---	60.3
M1-DNA1/M2-DNA2	520	651	131	---	64.0
M1-DNA1/M2-DNA3	529	655	126	0.25	64.7

Zur Untersuchung der Temperaturabhängigkeit der FRET-Effizienz wurden Fluoreszenzspektren der verschiedenen FRET-Systeme bei unterschiedlichen Temperaturen aufgenommen. Exemplarisch wird das Verhalten im **M1-DNA1/M2-DNA3**-System diskutiert (Abb. 45).

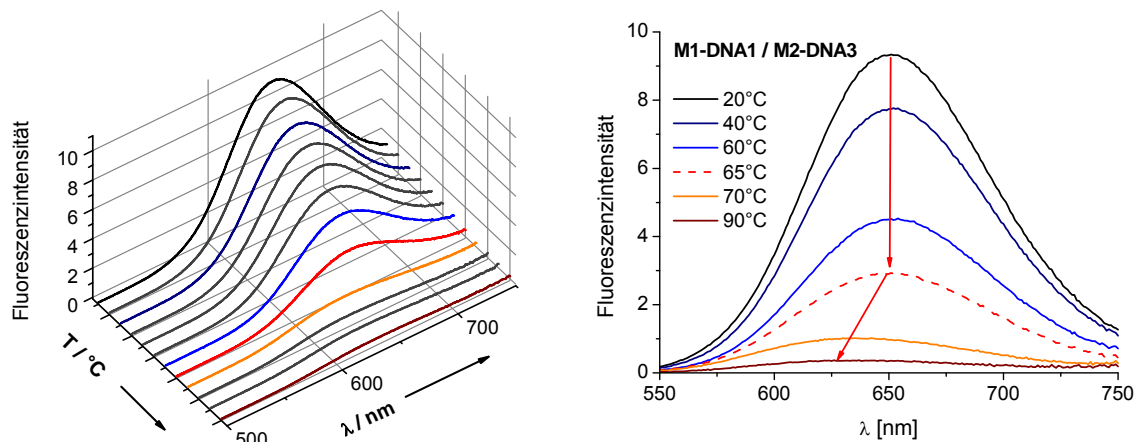


Abb. 45: Temperaturabhängige Fluoreszenzmessungen von **M1-DNA1/M2-DNA3** ($\lambda_{\text{ex}} = 450 \text{ nm}$).

Wie zu erwarten, nimmt die Emission mit steigender Temperatur ab, wobei sich die Lage des Emissionsspektrums bis zur Schmelztemperatur von 65°C kaum ändert. Es handelt sich fast ausschließlich um eine Akzeptoremission von **M2**. Durch Dehybridisierung des Duplexes und eine damit verbundene Trennung von Donor und Akzeptor verschiebt sich die Emission hypsochrom hin zur Donoremission. Es findet also kein FRET mehr statt. Dieser Effekt wird noch deutlicher, wenn man Abb. 45 und Abb. 41 vergleicht, da die Emission von **M2** im Einzelstrang gegenüber dem Doppelstrang rotverschoben erscheint.

Trägt man die Verhältnisse der Maxima der Akzeptor- und der Donoremission bei verschiedenen Temperaturen auf, so lässt sich ein sprunghafter Abfall von $I_{\max}(\mathbf{M2})/I_{\max}(\mathbf{M1})$ durch Dehybridisierung und Wegfall des FRET erkennen.

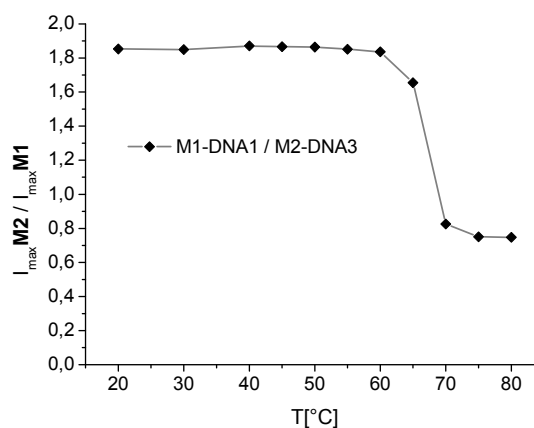


Abb. 46: Verhältnis der maximalen Emissionsintensität von FRET-Akzeptor und FRET-Donor

In den Absorptionsspektren der mit **M1** und **M3** modifizierten Oligonukleotid-Duplexe lässt sich wiederum eine Kombination aus **M1**- und **M3**-Absorption erkennen. Es ergeben sich zwei Maxima die je nach Duplex bei $\lambda = 505 - 509$ nm bzw. 612 - 623 nm liegen (vgl. Abb. 47). Die einzelnen FRET-Systeme unterscheiden sich in ihrem Absorptionsverhalten nur unwesentlich.

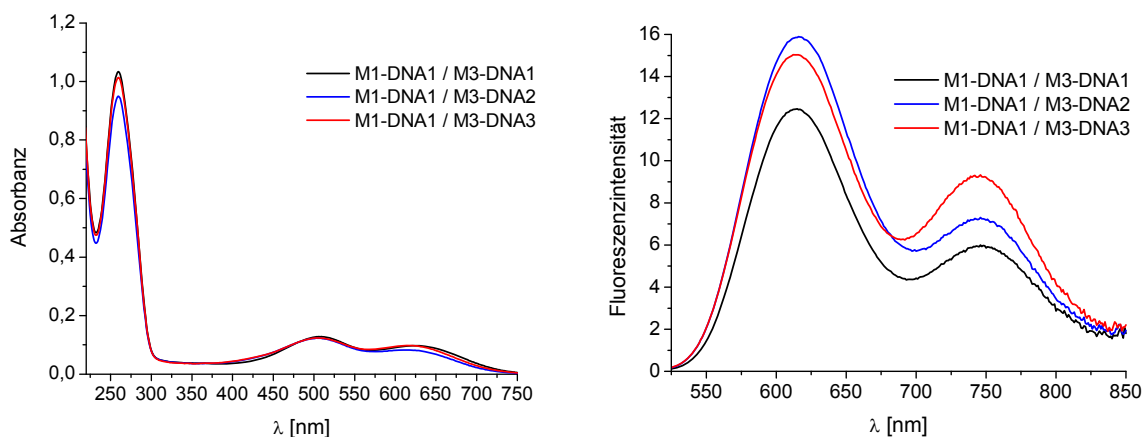


Abb. 47: Absorptions- und Emissionseigenschaften der **M1/M3** FRET-Duplexe ($\lambda_{\text{ex}} = 500 \text{ nm}$).

In den Fluoreszenzspektren sind sowohl die Emission von **M1** ($\lambda_{\text{max}} = 615 - 616 \text{ nm}$) als auch die langwelligere Emission von **M3** ($\lambda_{\text{max}} = 734 - 746 \text{ nm}$) zu erkennen. Die Emission der Duplexe **M1-DNA1/M3-DNA1** und **M1-DNA1/M3-DNA2** unterscheiden sich nur in ihrer Intensität. Die Form der Spektren und das Verhältnis von Donor- zu Akzeptoremission bleiben unverändert. Die Intensitätsunterschiede lassen sich durch die veränderte Umgebung und die fehlende Basenpaarung im Falle von **M1-DNA1/M3-DNA1** erklären. Im Duplex **M1-DNA1/M3-DNA3** nimmt die Emission des von **M3** gegenüber der von **M1** zu. Besonders deutlich wird dies bei Betrachtung der auf eins normierten Fluoreszenzen (Abb. 48).

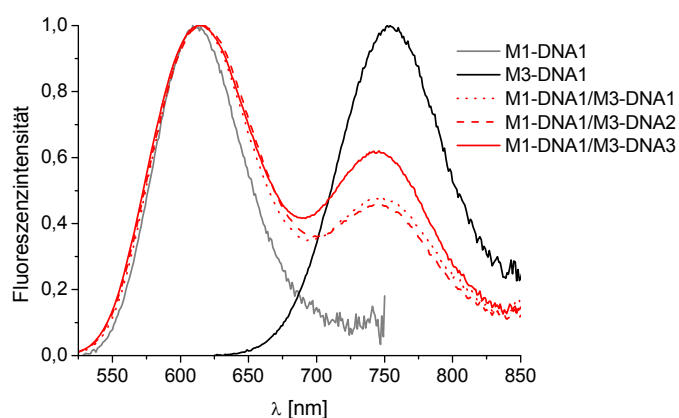


Abb. 48: Normierte Emissionsspektren von **M1-DNA1**, **M3-DNA1**, sowie der **M1/M3** FRET-Systeme

In Tabelle 4 sind die wichtigsten spektroskopischen Daten, sowie die Schmelztemperaturen der **M1/M3**-Systeme zusammengestellt.

Tabelle 4: Übersicht über die spektroskopischen Daten und T_m -Werte der **M1/M3** FRET-Systeme

DNA	$\lambda_{\text{abs}}[\text{nm}]$	$\lambda_{\text{em}}[\text{nm}]$	$\Delta\lambda[\text{nm}]$	Φ_F	$T_m[^\circ\text{C}]$
M1-DNA1/M3-DNA1	509/623	615/743	234	---	59.5
M1-DNA1/M3-DNA2	505/612	616/746	241	---	62.0
M1-DNA1/M3-DNA3	505/616	616/734	229	0.03	64.0

Die relativ geringe Akzeptoremission im Vergleich zur Donoremission lässt sich nicht auf eine schlechte FRET-Effizienz zurückführen, sondern ist vielmehr das Ergebnis der schlechten Quantenausbeuten von **M3**.

Die FRET-Effizienz lässt sich aufgrund der gut aufgelösten Fluoreszenzsignale von **M1** und **M3** nach folgender Formel berechnen:

$$E_{\text{FRET}} = 1 - \frac{I_{\text{DA}}}{I_{\text{D}}}$$

mit: E_{FRET} = FRET-Effizienz
 I_{DA} = Donorfluoreszenz in Anwesenheit des Akzeptors
 I_{D} = Donorfluoreszenz in Abwesenheit des Akzeptors

Man erhält daraus für das FRET-System **M1-DNA1/M3-DNA3** eine Effizienz von etwa 90%.

Um die Abhängigkeit der FRET-Effizienz von der Temperatur zu untersuchen und um eine Akzeptoremission durch direkte Anregung auszuschließen wurden Fluoreszenzspektren der verschiedenen FRET-Systeme bei unterschiedlichen Temperaturen aufgenommen. Exemplarisch wird das Verhalten im **M1-DNA1/M3-DNA3**-System diskutiert (Abb. 49). Zunächst nimmt sowohl die Emission des Fluoreszenzdonors **M1** als auch die Emission des Fluoreszenzakzeptors **M3** mit steigender Temperatur ab. Im Bereich der Schmelztemperatur ($T_m = 64^\circ\text{C}$) kommt es dann zu einer starken Abnahme der **M3**-Fluoreszenz, gleichzeitig durch Wegfall des FRET aber auch zu einem Anstieg der **M1**-Emission. Oberhalb der Dehybridisierungstemperatur ist keine Akzeptorfluoreszenz mehr zu erkennen und die Donorfluoreszenz sinkt mit steigender Temperatur ab.

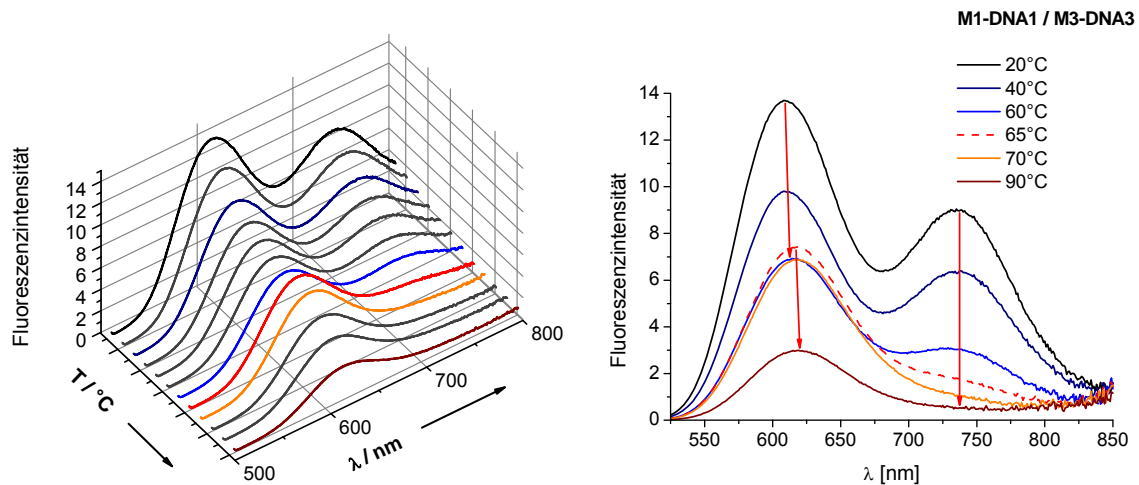


Abb. 49: Temperaturabhängige Fluoreszenzmessungen von **M1-DNA1/M3-DNA3** ($\lambda_{\text{ex}} = 500 \text{ nm}$).

Trägt man die Emissionsintensität bei 610 nm für **M1-DNA1** und **M1-DNA1/M3-DNA3** bei steigender Temperatur auf so erkennt man deutlich den Emissionsanstieg durch Wegfall des FRET. Auch bei der Auftragung der Verhältnisse der Maxima von Akzeptor- und Donoremission bei verschiedenen Temperaturen erkennt man eine sprunghafte Änderung im Bereich der Schmelztemperatur (Abb. 50).

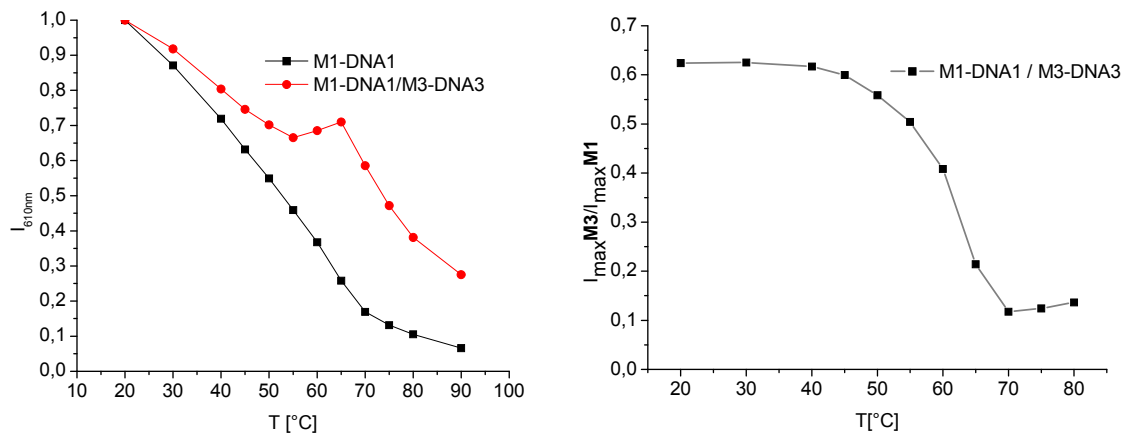


Abb. 50: Temperaturabhängige Emission bei $\lambda = 610 \text{ nm}$ (links); Verhältnis der maximalen Emissionsintensität von FRET-Akzeptor und FRET-Donor (rechts)

4.2 Bodipy-Fluoreszenzsonden mit großer Helligkeit

4.2.1 Hintergrund zu Bodipy-Derivaten in der Bio-Analytik

4,4-Difluoro-4-bora-3a,4a-diaza-s-indacene (Bodipy) sind weitverbreitete Fluoreszenzmarker in der Biochemie.^[197-201] Bodipy-Farbstoffe haben mehrere Vorteile, die sie für analytische Anwendungen interessant machen, darunter Lebenszeiten im Nanosekunden-Bereich, scharfe Emissions-Banden und hohe Quantenausbeuten.^[202, 203] Außerdem lassen sich die spektroskopischen und elektrochemischen Eigenschaften synthetisch relativ einfach in gewünschter Weise verändern.^[204-207] Bodipy-Farbstoffe werden vor allem zur Fluoreszenzmarkierung von Proteinen verwendet, an die sie über einen Linker angeknüpft werden.^[208, 209] In ähnlicher Weise können Bodipy-Fluorophore auch an DNA gebunden werden. Allerdings sind die Anwendungen durch die terminale Verknüpfung eingeschränkt.^[210-215]

Die Arbeitsgruppe *Wagenknecht* publizierte 2008 die Synthese sowie die optischen und elektrochemischen Eigenschaften einer Reihe Bodipy-funktionalisierter 2'-Deoxyuridine.^[216] Eines dieser Nukleoside (**BodU**; Abb. 51) wurde in Oligonukleotide eingebaut und es konnte gezeigt werden, dass DNA-Polymerasen die modifizierten Uridine erkennen und in Primerverlängerungsexperimenten selektiv A als Gegenbase verwenden.^[217]

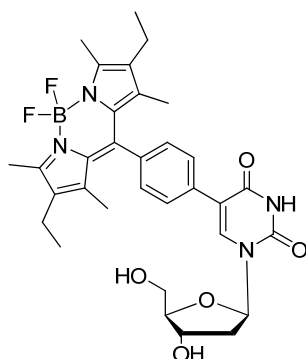


Abb. 51: Struktur des Bodipy-modifizierten Uridins **BodU**

Das Problem bei den verwendeten **BodU** modifizierten Oligonukleotiden besteht in der beinahe quantitativen Löschung der Fluoreszenz beim Übergang vom Einzel- in

den Doppelstrang.^[218] Grund für die Emissionslöschung ist vermutlich eine Verdrillung der Chromophor-Phenyl-Uridin-Bindungen und der dadurch erhöhte Anteil des ladungsgetrennten Zustands, ähnlich wie in einem TICT Zustand.^[219, 220] Möglicherweise kommt es in Folge der Ausbildung des ladungsgetrennten Zustands auch zu einer Ladungsinjektion in den DNA-Basenstapel und einer Guaninoxidation. Ein solcher photoinduzierter Ladungstransfer führt zu einer Löschung der Bodipy-Emission.^[205, 221] Um dies zu verhindern, sollte ein Bodipy-Fluorophor in einer Weise in DNA integriert werden, die eine elektronische Kopplung mit dem π -Basenstapel und somit eine Löschung der Fluoreszenz verhindert. Als Strategie wurde die in unserer Gruppe etablierte Verwendung eines acyclischen Linkers und der Einbau eines Bodipy-Basenersatzes gewählt.^[222-225] Insgesamt sollten zwei, am Boratom unterschiedlich substituierte Bodipy-Derivate als Basensurrogate in Oligonukleotide eingebaut werden.

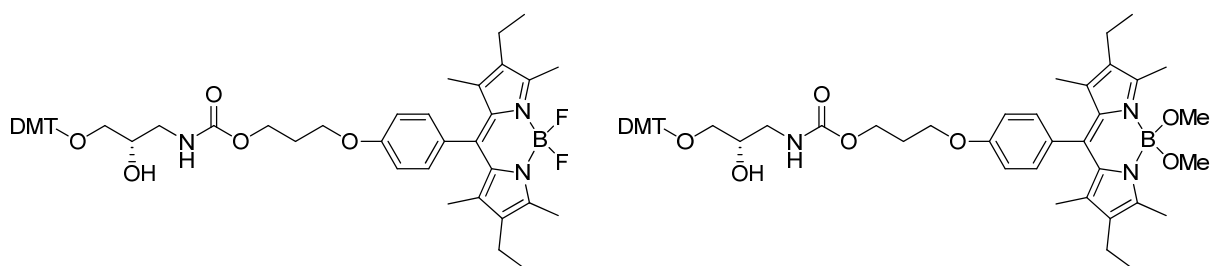


Abb. 52: Synthetisierte Bodipy-Basensurrogate für den Einbau in Oligonukleotide

Leider stellte sich das Methoxy-substituierte Bodipy-Linker-Konjugat (Abb. 52 rechts) als sehr hydrolyseempfindlich und sehr säureempfindlich heraus, weswegen die entsprechenden Oligonukleotide nicht über HPLC in wässrigen Medien aufgereinigt werden konnten und auch ein Einsatz in der DNA-Analytik aussichtslos erscheint. In den folgenden Abschnitten wird demnach ausschließlich auf das fluorsubstituierte Bodipy-Derivat (**Bo**) eingegangen.

4.2.2 Synthese und optische Eigenschaften des Bodipy-Basensurrogates

Zunächst wurde **7** durch eine nukleophile Substitutionsreaktion unter basischen Bedingungen aus 4-Hydroxybenzaldehyd und 1-Chlorpropan-3-ol dargestellt.^[226] Im zweiten Schritt folgte zunächst die säurekatalysierte zweifache elektrophile

aromatische Substitution von **7** am 2,4-Diethyl-3-methyl-pyrrol sowie die Oxidation des entstandenen Dipyrromethans zum Dipyrromethen. Dieses wurde nicht isoliert sondern direkt mit $\text{BF}_3 \cdot \text{OEt}_2$ zum entsprechenden 4,4-Difluoro-4-bora-3a,4a-diaza-s-indacen **8** ungesetzt. Im dritten Schritt wurde **8** unter Verwendung von 1,1'-Carbonyldiimidazol über eine Carbamat-Brücke an den DMT-geschützten acyclischen (S)-3-Amino-1,2-porpaniol Linker **L** gebunden (**9**). Die Synthese von **L** erfolgte nach Literaturvorschriften.^[135, 224, 227] Die Synthese des Phosphoramidit-Bausteins **10** erfolgte nach etablierten Standardbedingungen.^[222-225, 228]

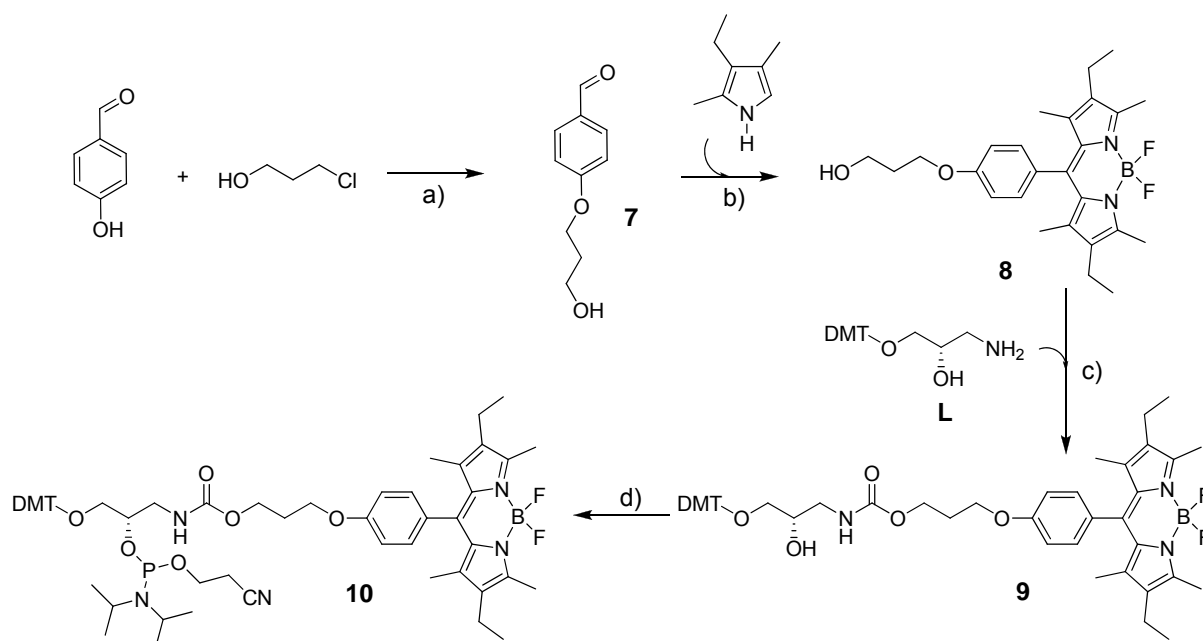


Abb. 53: Synthese des Bodipy-Phosphoramiditbausteins **10**: **a)** K_2CO_3 in DMF, 16 h, 60°C , 72%; **b)** 1) 2,4-Diethyl-3-methyl-pyrrol, kat. TFA, abs. DCM, 16 h, RT; 2) p-Chloranil, 6 h, RT; 3) $\text{BF}_3 \cdot \text{OEt}_2$ / NEt_3 , 6 h, RT; 64%; **c)** 1) CDI in abs. DMF, 6h, 35°C ; 2) **L**, 16 h, 35°C ; 79%; **d)** 2-Cyanoethoxy-*N,N*-diisopropylaminochlorophosphoramidit / DIPEA in abs. DCM, 2 h, RT, 99%.

Um die spektroskopischen Eigenschaften von **8** zu untersuchen, wurden Absorptions- und Emissionsspektren in MeOH aufgenommen. Im Absorptionsspektrum lässt sich der S_0 - S_2 -Übergang mit einem maximalen molaren Extinktionskoeffizienten von $6000 \text{ L mol}^{-1}\text{cm}^{-1}$, sowie der S_0 - S_1 -Übergang mit $\epsilon_{\text{max}} = 50000 \text{ L mol}^{-1}\text{cm}^{-1}$ bei $\lambda_{\text{max}} = 521 \text{ nm}$ und einer Schulter bei $\lambda = 495 \text{ nm}$ erkennen. Die Stokes-Verschiebung der Emission ist, wie bei Bodipy-Farbstoffen üblich, gering.^[203] Das Emissionsspektrum zeigt ein Maximum bei $\lambda = 532 \text{ nm}$ und eine Schulter bei 565 nm . Damit unterscheidet sich **8**, wie zu erwarten, nicht wesentlich vom Bodipy-modifizierten Uridin **BodU**.^[216]

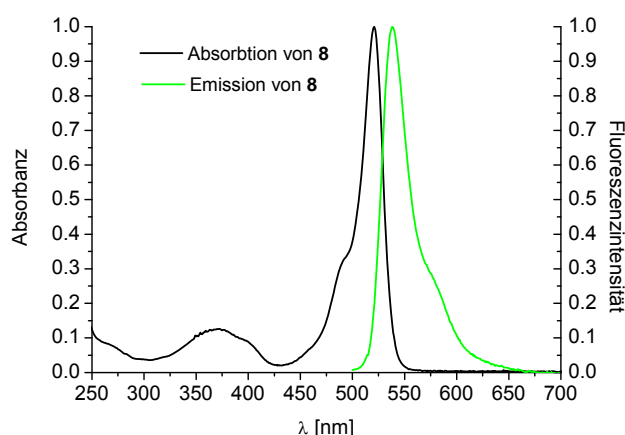


Abb. 54: Normiertes Absorptions- (schwarz) und Emissionsspektrum (grün) von **8** ($\lambda_{\text{ex}} = 510 \text{ nm}$).

4.2.3 Untersuchung Bo-modifizierter Oligonukleotide

Zunächst wurde das Bodipy-Basensurrogat **Bo** in unterschiedlichen Umgebungen in Oligonukleotide eingebaut, um den Effekt unterschiedlicher Nachbar- und Gegenbasen zu untersuchen.

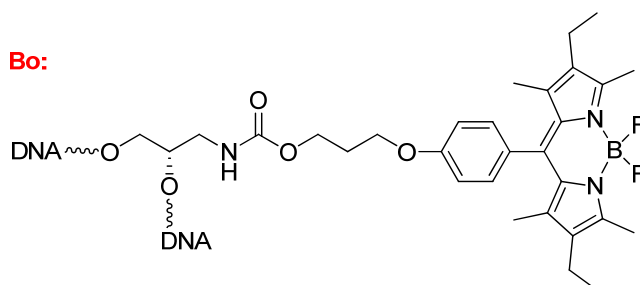
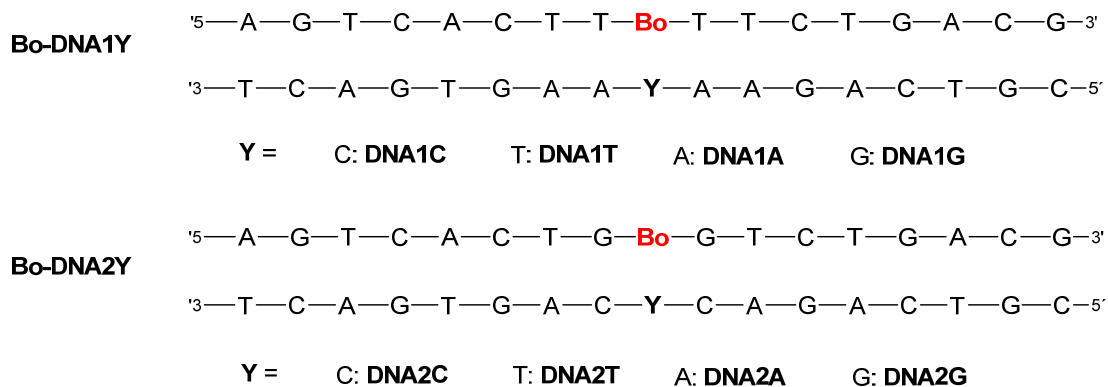


Abb. 55: Sequenzen der **Bo**-modifizierten Oligonukleotide

In den Absorptionsspektren lassen sich sowohl bei **Bo-DNA1Y** als auch bei **Bo-DNA2Y** kaum Unterschiede zwischen den unterschiedlichen Oligonukleotiden

erkennen. Lediglich die in den Duplexen im Vergleich zu **Bo-DNA1ss** bzw. **Bo-DNA2ss** und dem freien Farbstoff geringer ausgeprägte Absorptionsschulter bei $\lambda = 510$ nm lässt auf Wechselwirkungen des Farbstoffs mit der DNA schließen.

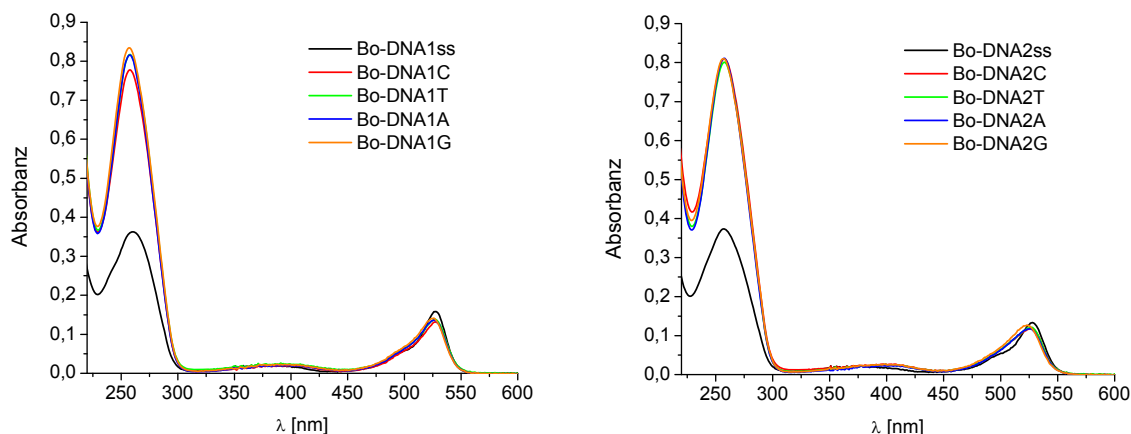


Abb. 56: Absorptionsspektren der Oligonukleotide **Bo-DNA1Y** und **Bo-DNA2Y**.

In den Emissionsspektren sind Intensitätsunterschiede sowohl zwischen einzel- und doppelsträngigen Oligonukleotiden (**Bo-DNA1ss** vs. **Bo-DNA1Y** bzw. **Bo-DNA2ss** vs. **Bo-DNA2Y**) als auch zwischen Oligonukleotiden mit unterschiedlichen Nachbarbasen (**Bo-DNA1** vs. **Bo-DNA2**) zu erkennen (Abb. 57). Es zeigt sich, dass die Emission der Duplexe gegenüber der der Einzelstränge um 20% - 40% verringert ist. Die Fluoreszenzintensität von **Bo-DNA1Y** liegt generell etwa 30% über den entsprechenden **Bo-DNA2** Strängen. Eine klare Tendenz für den Einfluss der Gegenbasen lässt sich aus den Ergebnissen nicht erkennen.

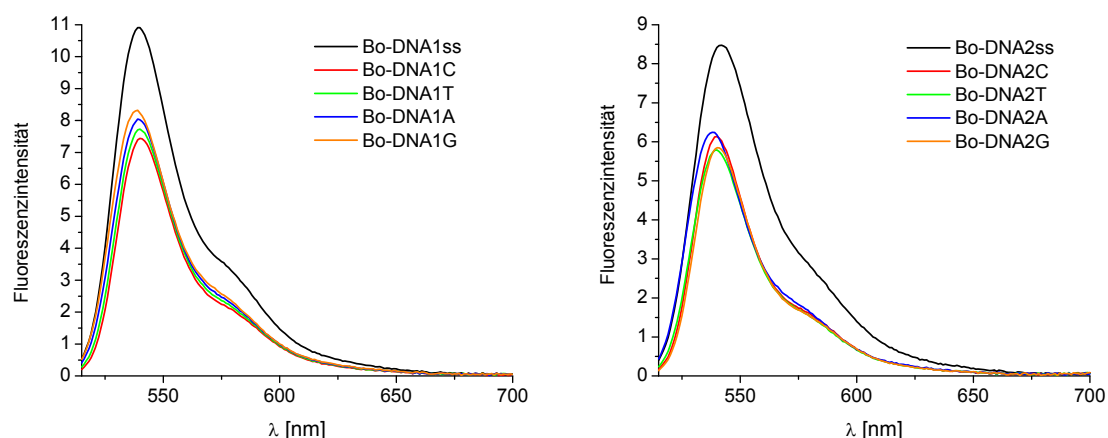


Abb. 57: Emissionsspektren der Oligonukleotide **Bo-DNA1Y** und **Bo-DNA2Y** ($\lambda_{\text{ex}} = 510$ nm).

Begründen lässt sich dieses Verhalten durch die zwar verringerte aber nicht vollständig unterdrückte Fluoreszenzlöschung durch Guaninoxidation mittels photoangeregtem **Bo**. In **Bo-DNA1ss** und **Bo-DNA2ss** sind solche Elektronenübertragungen aufgrund der flexiblen und ungeordneten Struktur des Einzelstranges recht unwahrscheinlich und die Bodipy-Emission wird durch die DNA kaum beeinflusst. In den Duplexen **Bo-DNA1Y** und **Bo-DNA2Y** wird der Farbstoff durch die rigide DNA-Struktur in eine bestimmte Orientierung entlang einer der Furchen der DNA-Helix gezwungen. Durch die so erzwungene räumliche Nähe zum π -Basenstapel und die konformationelle Dynamik der Helix (z.B. „base flipping“) kommt es zu Orbitalwechselwirkungen, welche die photoinduzierte Übertragung von Elektronen von Bodipy auf DNA und somit eine Fluoreszenzlöschung ermöglichen. Dieser Effekt ist im Falle benachbarter Guanine stärker ausgeprägt. Aufgrund der fehlenden Basenpaarungseigenschaften von **Bo** hat die Gegenbase nur einen geringen Einfluss auf das Emissionsverhalten.

Neben den spektroskopischen Untersuchungen wurden auch Schmelztemperaturmessungen durchgeführt. Wie aufgrund der fehlenden Basenpaarungseigenschaften von **Bo** erwartet, lassen sich keine signifikanten Stabilitätsunterschiede innerhalb der Serien **Bo-DNA1Y** und **Bo-DNA2Y** erkennen. Die Schmelztemperaturen der **Bo-DNA2** Duplexe liegen aufgrund des Austausches von AT- durch GC-Basenpaare etwa 7°C über denen der **Bo-DNA1** Duplexe. Verglichen mit den entsprechenden unmodifizierten Referenzduplexen ergeben sich aufgrund der fehlenden Wasserstoffbrücken und der durch den acyclischen Linker gestörten Struktur Destabilisierungen von etwa 5 - 7°C. Gegenüber anderen, auf ähnliche Weise in Oligonukleotide eingebauten Modifikationen fallen die Verringerungen der Schmelztemperaturen für **Bo** eher gering aus.^[228, 229]

Die wichtigsten spektroskopischen Daten, sowie die Schmelztemperaturen der einzelnen Oligonukleotide sind in Tabelle 5 zusammengefasst.

Tabelle 5: Spektroskopische Daten und T_m -Werte der Oligonukleotide **Bo-DNA1Y** und **Bo-DNA2Y**

DNA	T_m (°C)	ΔT_m (°C) ^a	$\lambda_{\max}(\text{abs})[\text{nm}]$	$\lambda_{\max}(\text{em})[\text{nm}]$	Φ_F
Bo-DNA1ss			528	540	0.88
Bo-DNA1C	55.7	-6.8	527	540	0.69
Bo-DNA1T	55.8	-6.7	526	540	0.65

Bo-DNA1A	55.8	-6.7	526	539	0.69
Bo-DNA1G	55.7	-6.8	526	539	0.68
Bo-DNA2ss			528	542	0.81
Bo-DNA2C	63.3	-4.7	526	540	0.47
Bo-DNA2T	62.3	-5.7	526	540	0.49
Bo-DNA2A	62.1	-5.9	525	538	0.47
Bo-DNA2G	62.0	-6.0	523	540	0.46

Um zu untersuchen, ob sich durch den Einbau mehrerer Bodipy-Chromophore in räumlicher Nähe in ein Oligonukleotid fluoreszente Aggregate bilden können, wurden **Bo-DNA3** und **Bo-DNA4** synthetisiert. Im einen Fall sind die **Bo**-Bausteine in direkter Nachbarschaft (**Bo-DNA3**), im anderen Fall sind sie durch zwei Basenpaare getrennt (**Bo-DNA4**). Die Oligonukleotidsequenzen sind in Abb. 58 dargestellt.

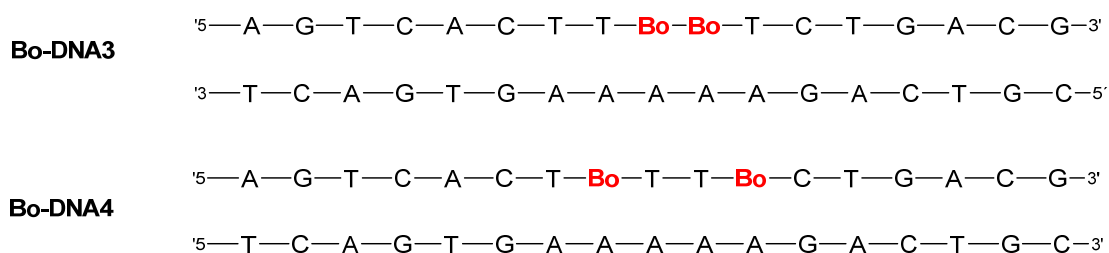


Abb. 58: Doppelt modifizierte Oligonukleotide zur Untersuchung von Aggregationseffekten

Aus den im Vergleich zum freien Farbstoff beinahe unveränderten Absorptionsspektren erkennt man, dass im Grundzustand keine Wechselwirkungen zwischen den beiden Bodipy-Modifikationen vorliegen (Abb. 59). Anhand der im Gegensatz zu den Duplexen **Bo-DNA1Y** stärker ausgeprägten Schulter im Bereich um $\lambda = 510$ nm lässt sich schließen, dass der Fluorophor hier nicht durch die rigide Helixstruktur in eine geänderte Geometrie gezwungen wird. Grund dafür ist höchstwahrscheinlich eine starke lokale Störung der B-DNA-Struktur durch den Einbau der zweier Störstellen (**Bo**-Bausteine) in räumlicher Nähe. Die Absorptionsmaxima liegen bei $\lambda = 527$ nm (**Bo-DNA3**) und $\lambda = 523$ nm (**Bo-DNA4**). Dies steht im Kontrast zu Experimenten mit doppelt markierten Proteinen, für die eine Ausbildung von Bodipy-Dimeren im Grundzustand beschrieben wird.^[230] Allerdings tragen die dort verwendeten Bodipy-Derivate weitaus weniger

Substituenten am Dipyrrromethen-Grundgerüst. Es ist demnach gut möglich, dass eine Dimerbildung im Grundzustand durch die vielen Substituenten unterdrückt wird. Die Emissionsspektren der doppelt modifizierten Oligonukleotide sind in ihrer Lage und Form mit denen von **Bo-DNA1** nahezu identisch. Das Emissionsmaximum liegt in allen Fällen bei $\lambda = 542$ nm. Es kommt offensichtlich nicht zur Bildung fluoreszenter Aggregate, sondern nur zur Emission angeregter Bodipy-Monomere.

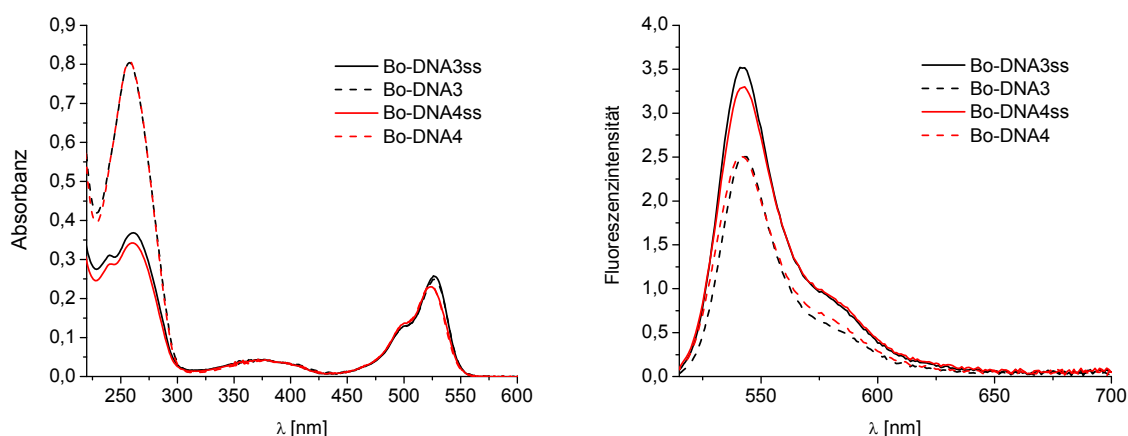


Abb. 59: Absorptions- und Emissionsspektren der zweifach modifizierten Oligonukleotide **Bo-DNA3ss**, **Bo-DNA3**, **Bo-DNA4ss** und **Bo-DNA4** ($\lambda_{\text{ex}} = 510$ nm).

Die Emissionsintensitäten von **Bo-DNA3** bzw. **Bo-DNA4** sind verglichen mit denen von **Bo-DNA1** stark verringert (vgl. Abb. 60). Die Emissionslöschung lässt sich vermutlich auf die Ausbildung nicht fluoreszenter Bodipy-Dimere im angeregten Zustand zurückführen. Bergström et al. und Tleugabulova et al. beschrieben ebenfalls die Ausbildung nicht-emittierender angeregter Bodipy-Dimere.^[230, 231] Da ein Gleichgewicht zwischen Dimerenbildung und Monomeren im angeregten Zustand vorliegt wird die Emission nur größtenteils, aber nicht komplett gelöscht.

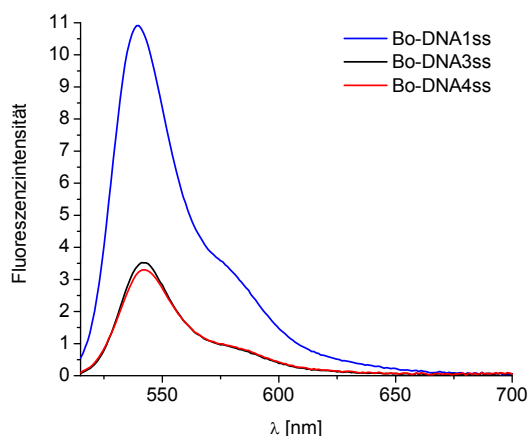


Abb. 60: Vergleich der Emissionsintensitäten von **Bo-DNA1**, **Bo-DNA3** und **Bo-DNA4**.

4.2.4 Einfluss der Konformation des acyclischen Linkers

Da es sich bei dem in unserer Gruppe verwendeten acyclischen Linker um ein chirales Molekül handelt, sollte geklärt werden, ob eine geänderte Linker-Konformation zu Änderungen in den spektroskopischen Eigenschaften führt.

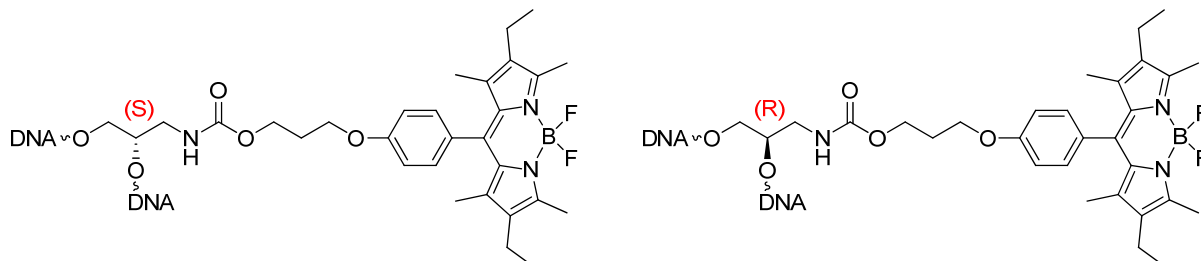


Abb. 61: Bo-Derivate mit unterschiedlicher Linkerkonformation

Es wurden die zu **Bo-DNA1** bzw. **Bo-DNA2** analogen Oligonukleotide **(R)-Bo-DNA1** und **(R)-Bo-DNA2**, in denen die Verknüpfung unter Verwendung des (R)-konfigurierten Linkers erfolgt, synthetisiert.

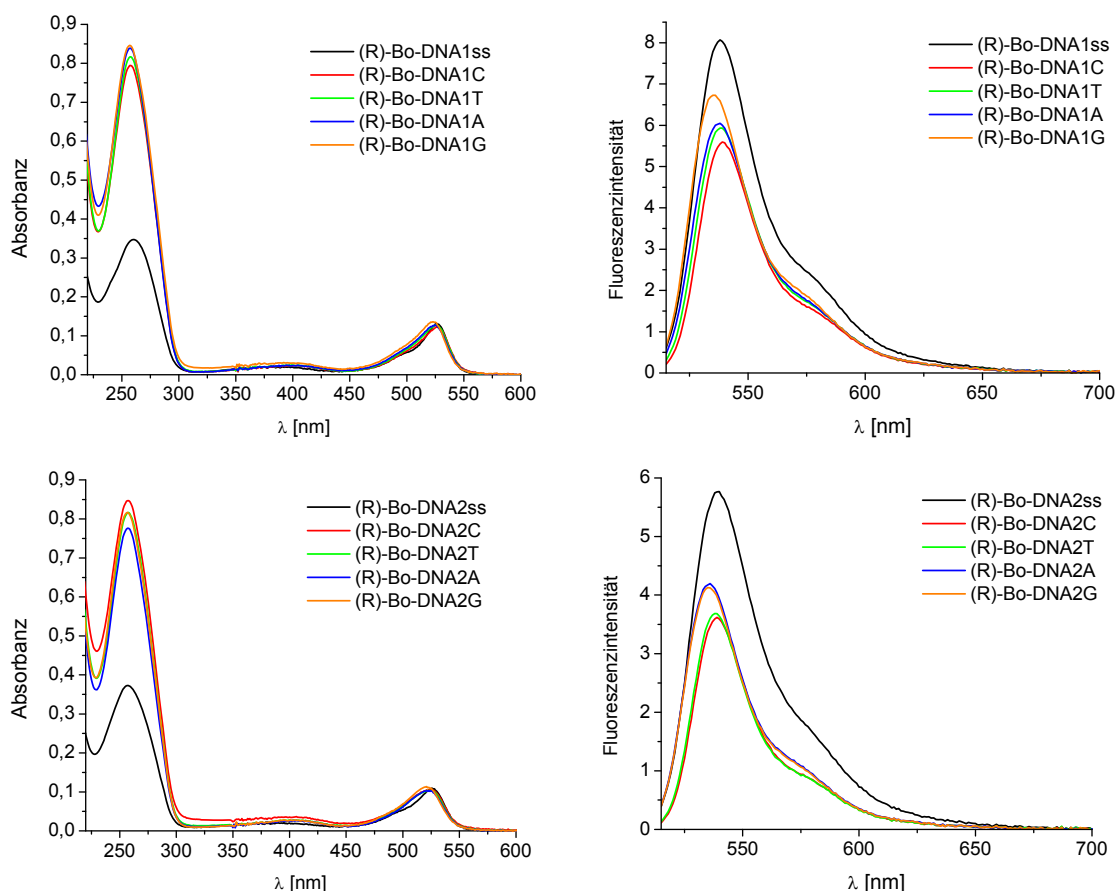


Abb. 62: Absorptions- und Emissionsspektren der Oligonukleotide **(R)-Bo-DNA1Y** und **(R)-Bo-DNA2Y** ($\lambda_{\text{ex}} = 510 \text{ nm}$).

Die spektroskopischen Untersuchungen zeigten keine signifikanten Änderungen gegenüber **Bo-DNA1** bzw. **Bo-DNA2** (siehe Abb. 62). Auch die Duplexstabilität wird durch die Änderung der Linker-Konformation nicht beeinflusst. Diese Beobachtungen stehen im Einklang mit Ergebnissen zum Einfluss der Linker-Konformation mit Nilblau-modifizierten Oligonukleotiden innerhalb unserer Gruppe.^[232]

4.2.5 Vergleich zwischen Bo- und BodU-modifizierten Oligonukleotiden

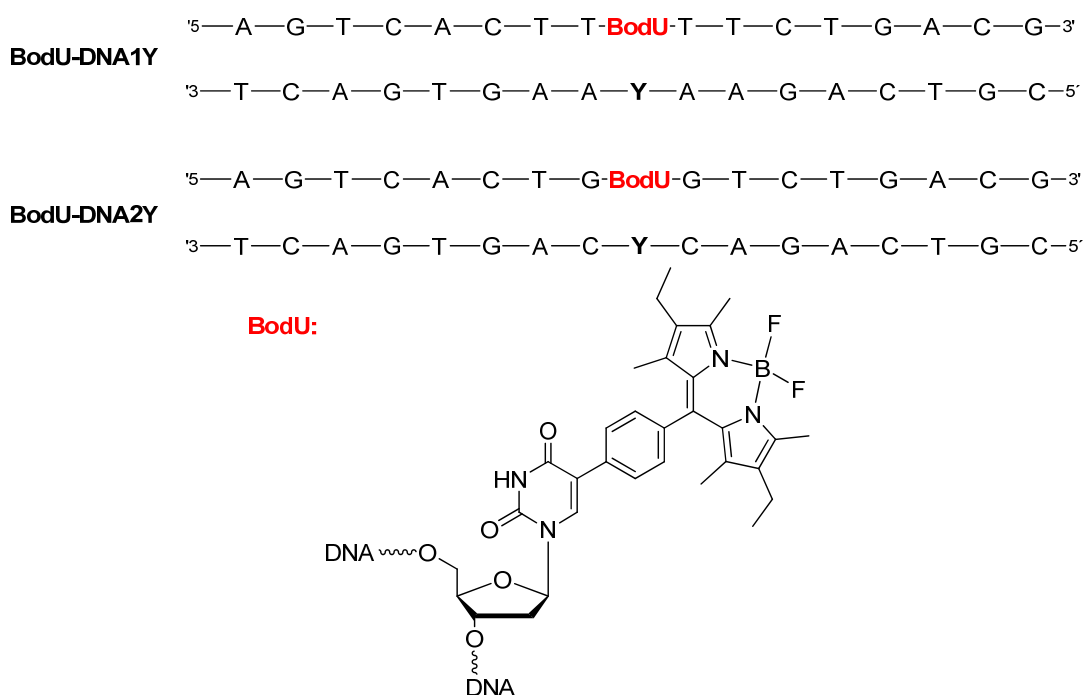


Abb. 63: Sequenzen der BodU-modifizierten Oligonukleotide **BodU-DNA1Y** und **BodU-DNA2Y**

Stellt man die Ergebnisse aus den Untersuchungen mit **Bo**-Oligonukleotiden und die Ergebnisse aus früheren Untersuchungen mit **BodU**-Oligonukleotiden gegenüber so lässt sich folgendes feststellen:

- Die Schmelztemperaturen der **BodU**-Duplexe sind selbst in den Duplexen **BodU-DNA1A** und **BodU-DNA2A** nur unwesentlich höher als in den entsprechenden **Bo**-Oligonukleotiden. Durch die starre Anbindung stört der große Chromophor offensichtlich trotz „intakter“ Basenpaarung die DNA-Struktur.

- Die Schmelztemperaturen der **BodU**-Oligonukleotide zeigen eine deutliche Präferenz der „richtigen“ Gegenbase A. In den **Bo**-Duplexen lassen sich keine signifikanten Unterschiede in Abhängigkeit von der Gegenbase feststellen.
- Das Problem der Fluoreszenzlöschung in den **BodU**-Duplexen konnte durch die Anbindung des Fluorophors über einen acyclischen flexiblen Linker minimiert werden.

Tabelle 6: Schmelztemperaturen, Quantenausbeuten und Helligkeit von **BodU-DNA1Y**, **BodU-DNA2Y**, **Bo-DNA1Y** und **Bo-DNA2Y**.

DNA	T _m (°C)	ΔT _m (°C) ^a	Φ _F	B
BodU-DNA1C	50.0	-12.5	0.05	1280
BodU-DNA1T	50.0	-12.5	0.03	720
BodU-DNA1A	57.5	-5.0	0.005	120
BodU-DNA1G	50.5	-12.0	0.01	250
BodU-DNA2C	60.5	-7.5	0.06	2350
BodU-DNA2T	59.3	-8.7	0.04	1650
BodU-DNA2A	64.5	-3.5	0.02	850
BodU-DNA2G	60.5	-7.5	0.03	1330
Bo-DNA1C	55.7	-6.8	0.69	36400
Bo-DNA1T	55.8	-6.7	0.65	35600
Bo-DNA1A	55.8	-6.7	0.69	38200
Bo-DNA1G	55.7	-6.8	0.68	38400
Bo-DNA2C	63.3	-4.7	0.47	22100
Bo-DNA2T	62.3	-5.7	0.49	22800
Bo-DNA2A	62.1	-5.9	0.47	22000
Bo-DNA2G	62.0	-6.0	0.46	23400

Aus Tabelle 6 kann man entnehmen, dass die **Bo**-Oligonukleotidduplexe die analogen **BodU**-Duplexe in ihren Quantenausbeuten und der Helligkeit um ein Vielfaches übertreffen. Dies ist auf die nahezu quantitative Löschung der BodU-Emission beim Übergang vom Einzel- in den Doppelstrang zurückzuführen. Um die Unterschiede zu verdeutlichen sind in Abb. 64 exemplarisch die Emissionen ausgewählter **BodU**- und **Bo**-Oligonukleotide gegenübergestellt.

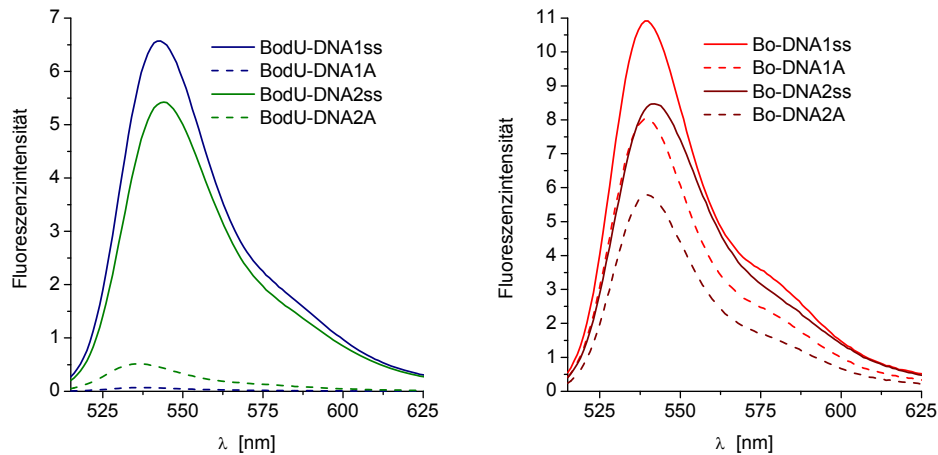


Abb. 64: Vergleich der Emissionsspektren von **Bo-** und **BodU-**modifizierten Oligonukleotiden.

4.2.6 Vergleich zwischen Bodipy- und Fluorescein-markierten Oligonukleotiden

Aufgrund der extrem hohen Quantenausbeuten der **Bo**-Oligonukleotide (vgl. Tabelle 6) sollten diese mit fluoresceinmarkierten Oligonukleotiden (bezogen von *Metabion*) verglichen werden. Diese werden aufgrund ihrer großen Helligkeit häufig in der DNA Analytik verwendet.^[233-236] In Abb. 65 sind die normierten Absorbanzen bzw. Emissionen von **Bo-DNA1A** und der sequenzgleichen, mit Fluorescein markierten **Flu-DNA1A** dargestellt. Die **Bo**-Oligonukleotide (rot) haben schmalere Banden und sind im Vergleich zu den **Flu**-Oligonukleotiden bathochrom verschoben.

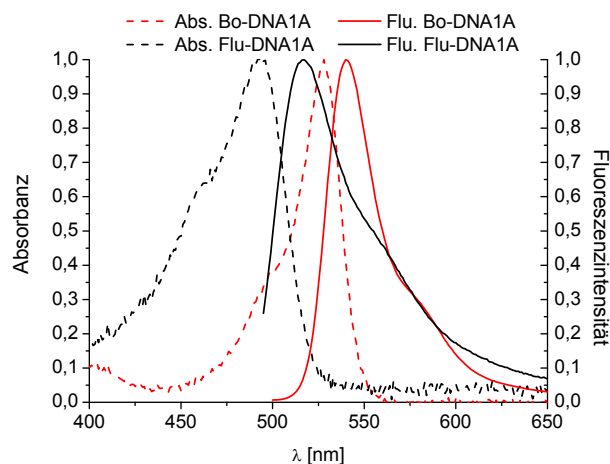


Abb. 65: Vergleich der Absorptions- und Emissionseigenschaften der mit Bodipy oder Fluorescein modifizierten Oligonukleotide.

Die Quantenausbeuten und die Helligkeit der beiden Fluoreszenz-Markierungen unterscheiden sich deutlich. Während Fluorescein Quantenausbeuten von 0.53 (**Flu-DNA1A**) bzw. 0.47 (**Flu-DNA1ss**) und Helligkeiten von 20.000 M⁻¹cm⁻¹ bzw. 18.000 M⁻¹cm⁻¹ aufweist, erreicht Bodipy Φ_F -Werte von 0.88 (**Bo-DNA1ss**) bzw. 0.69 (**Bo-DNA1A**) und Helligkeiten von 54.000 M⁻¹cm⁻¹ bzw. 38.000 M⁻¹cm⁻¹ (vgl. Tabelle 7). Damit übertreffen die **Bo**-Oligonukleotide die routinemäßig verwendeten, mit Fluorescein markierten Oligonukleotide in der Helligkeit um mehr als das Doppelte.

Tabelle 7: Spektroskopische Daten der mit Bodipy und Fluorescein markierten Oligonukleotide

DNA	λ_{abs} [nm]	λ_{em} [nm]	Φ_F	B
Bo-DNA1ss	528	540	0.88	54000
Bo-DNA1A	526	529	0.69	38000
Flu-DNA1ss	492	521	0.53	20000
Flu-DNA1A	492	517	0.47	18000

Die Daten aus den Emissionsmessungen legen nahe, dass **Bo** als Fluoreszenz-Marker in DNA dem standardmäßig verwendeten Fluorescein überlegen ist und daher breite Anwendung in der DNA-Analytik finden könnte. Für analytische und bioanalytische Anwendungen spielen jedoch nicht allein die optischen Eigenschaften eines Farbstoffs eine entscheidende Rolle. Auch Faktoren wie die Photostabilität oder die Hydrolyseempfindlichkeit können den Einsatz eines Markers einschränken. Daher wurden exemplarisch für die **Bo-DNA1ss** und **Bo-DNA1A** Bestrahlungsexperimente mit einer 75 W Xe-Lampe durchgeführt. Der Abfall der Emission über die Zeit wurde mit den gleichen Messungen für **Flu-DNA1ss** und **Flu-DNA1A** verglichen. Um eine Schädigung der DNA durch UV-Licht zu vermeiden, wurde ein optischer Filter verwendet, der unterhalb von $\lambda = 350$ nm kein Licht mehr durchlässt. Die Ergebnisse für die Duplexe sind in Abb. 66 dargestellt. Im Falle der Einzelstrangbestrahlungen wurden ähnliche Ergebnisse erhalten.

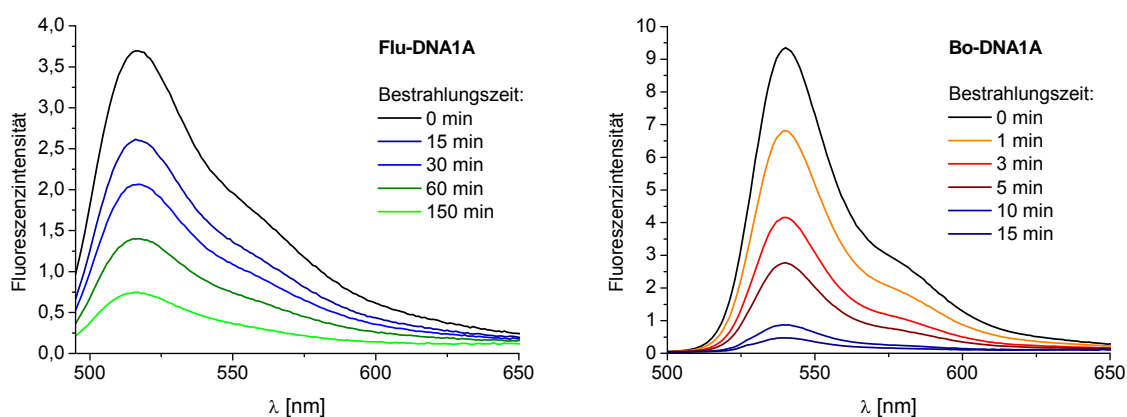


Abb. 66: Emissionsspektren der Oligonukleotide während der Bestrahlungsexperimente aufgenommen nach unterschiedlichen Belichtungszeiten.

Die Emission des Fluoresceins ist nach 60 min Bestrahlungszeit noch immer bei etwa 40 % des Ausgangswertes, während bei Bodipy bereits nach 10 min nur noch etwa 10 % der Anfangsemission erreicht werden (vgl. Abb. 66). Auf den ersten Blick überrascht dieses Ergebnis, da Bodipy-Farbstoffe als relativ photostabil gelten.^[237] Allerdings wird bei solchen Photostabilitätsmessungen normal nicht in wässrigen Puffern gearbeitet. Durch das die geringe Photostabilität wird auch der Anwendungsbereich für **Bo**-Oligonukleotide limitiert.

4.3 Synthese neuer 2'-OH modifizierter Nukleoside für die postsynthetische DNA-Funktionalisierung

Die Funktionalisierung der 2'-OH-Gruppen von natürlichen Nukleosiden hat in den letzten Jahren aufgrund ihrer Anwendung in der Antisense Technologie stark an Bedeutung gewonnen.^[238, 239] Die Forschung beschränkte sich dabei allerdings größtenteils auf in der Medizin einsetzbare Nukleosid-Derivate. Dabei bieten 2'-OH-Modifikationen eine interessante Möglichkeit um funktionelle Gruppen in Nukleoside einzuführen, die für die postsynthetische DNA- oder RNA-Funktionalisierung eingesetzt werden können.

Die wichtigsten Methoden für eine postsynthetische Modifikation der DNA wurden bereits in Kapitel 3.2.2 erläutert. In diesem Kapitel soll nun eine einfache Möglichkeit

für die Darstellung von unterschiedlichen Nukleosidbausteinen, die sich zur postsynthetischen Modifikation von Oligonukleotiden durch Klick-Chemie, Diels-Alder-Cycloaddition und zur Anknüpfung reaktiver Gruppen über Thiole eignen, vorgestellt werden. Da sich in der Arbeitsgruppe *Wagenknecht* 2'-Alkin-modifizierte Uridine als Bausteine für postsynthetische Klick-Reaktionen bewährt haben,^[62] sollte die Funktionalisierung der Nukleosidbausteine an der 2'-OH-Gruppe stattfinden. Ebenfalls in der Arbeitsgruppe *Wagenknecht* konnte gezeigt werden, dass auch nach der postsynthetischen Modifikation durch Klick-Chemie an 2'-Alkin-modifizierten Uridinen die Basenpaarungseigenschaften der Oligonukleotide komplett erhalten bleiben.^[61] Aufgrund der stärkeren Basenpaarungseigenschaften im Vergleich zu Uridin, und um das Repertoire der Arbeitsgruppe auf die postsynthetische Modifikation anderer Nukleobasen als Uridin auszuweiten, sollten Cytidine in 2'-OH-Position derart modifiziert werden, dass sie zur postsynthetischen DNA-Funktionalisierung eingesetzt werden können.

Dazu wurden ein terminales Alkin, ein Furan und ein geschütztes Thiol über Alkyl-Linker an die 2'-OH-Position von Cytidin geknüpft. Die synthetisierten Nukleosidbausteine sind in Abb. 67 dargestellt. Während alkin- und furanfunktionalisierte DNA-Bausteine ohne Verwendung zusätzlicher Schutzgruppen für die DNA-Festphasensynthese verwendet werden können,^[62, 240] muss die Thiol-Gruppe geschützt werden. Die Schutzgruppe wurde so gewählt, dass sie gemeinsam mit den Schutzgruppen der DNA-Basen bei der basischen Abspaltung der Oligonukleotide von der festen Phase entfernt wird.^[241]

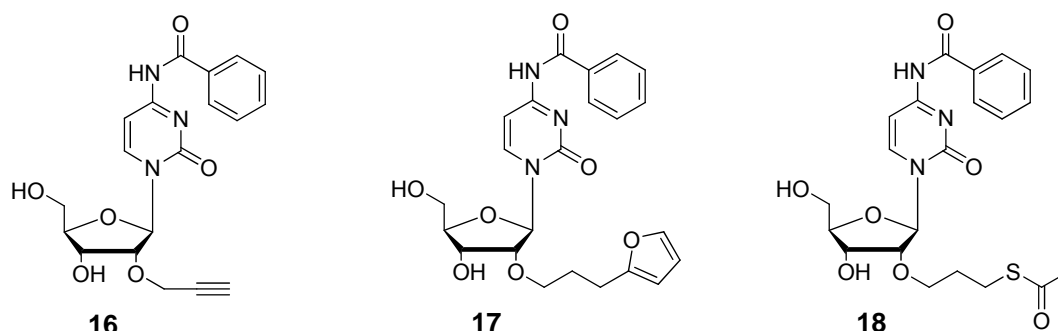


Abb. 67: Funktionalisierte Cytidin-Derivate für die postsynthetische DNA-Modifikation

Die gewählte Synthesestrategie (Abb. 68) wurde bereits von anderen Gruppen erfolgreich zur Einführung von Modifikationen an der 2'-OH-Gruppe von Cytidin angewendet^[242] und gleicht im Wesentlichen der in unserer Arbeitsgruppe

etablierten Synthese des 2'-Alkin-funktionalisierten Uridins **5** (vgl. Abb. 35). Sie ist sehr robust und lässt sich prinzipiell auf die Anknüpfung verschiedenster Alkylhalogenid-Derivate an die 2'-OH-Gruppe aller Nukleobasen ausweiten.

Im ersten Schritt wird die exocyclische Amino-Gruppe am Cytidin nach einer literaturbekannten Vorschrift benzoylgeschützt (**11**).^[243] Im zweiten Schritt werden unter Verwendung von 1,3-Dichloro-1,1,3,3-tetraisopropyldisiloxan selektiv die 3'-OH- und 5'-OH-Gruppen des Nukleosids geschützt (**12**). Anschließend wird unter Verwendung des entsprechenden Alkylhalogenid-Derivates R-X und einer Phosphazenen-Base die, für die postsynthetische Modifikation benötigte, funktionelle Gruppe an die 2'-OH-Gruppe des Zuckers geknüpft (**13**, **14**, **15**). Es folgen die Entschützung der OH-Gruppen der Ribose durch $\text{NEt}_3 \cdot 3\text{HF}$ (**16**, **17**, **18**), sowie die DMT-Schützung der 5'-OH-Position des Zuckers (**19**, **20**, **21**).

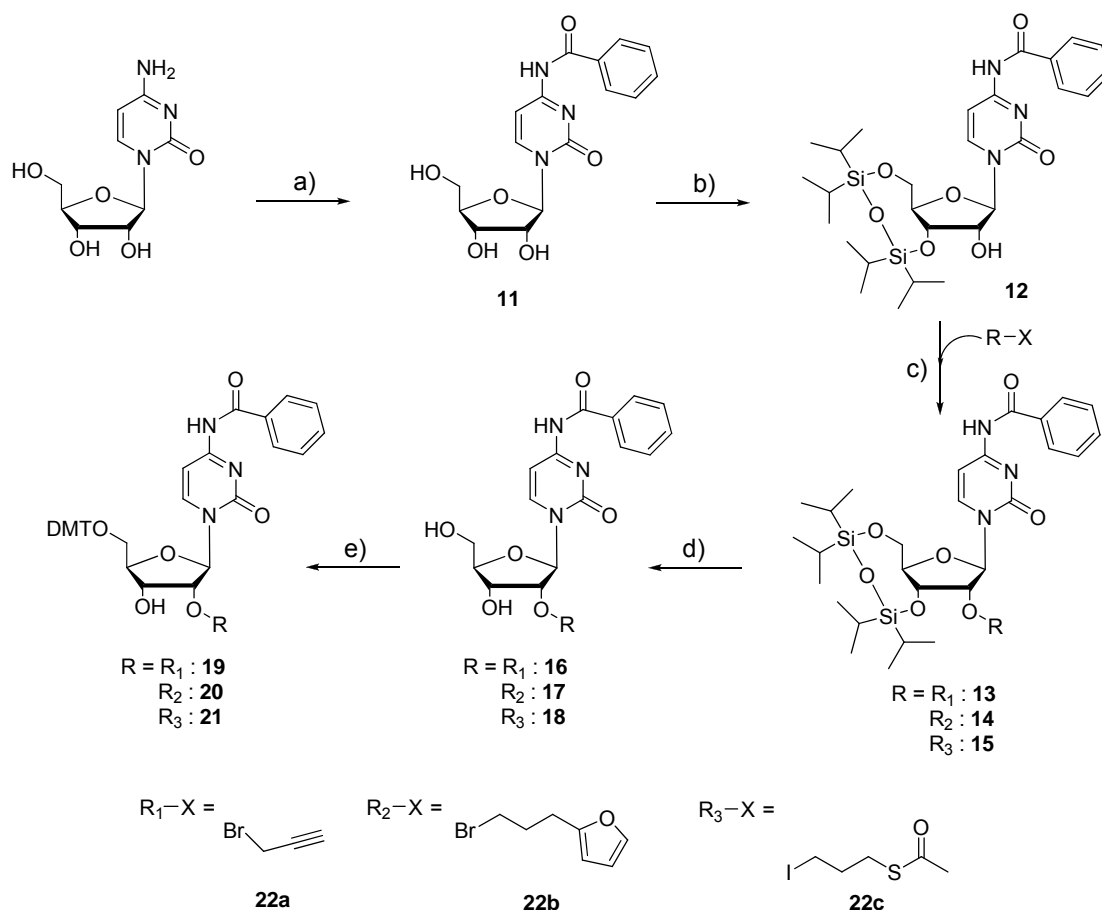


Abb. 68: Allgemeine Darstellung der 2'-OH funktionalisierten Cytidin-Derivate **19**, **20** und **21**:
a) Bz_2O in Dioxan/ H_2O , 4 h, 90°C , 93%; **b)** TIPDSiCl_2 , abs. Pyridin, 6 h, RT, 91 %; **c)** R-X, Phosphazenen-Base P1-t-Bu in abs. MeCN, 15 min bei 0°C , 2h bei RT, 61% – 69% %; **d)** $\text{Et}_3\text{N} \cdot 3\text{HF}$ in abs. THF, ü.N., RT, 72% - 81 % **e)** DMT-Cl in abs. Pyridin, ü.N., RT, 83% – 87%;

Während Propargylbromid kommerziell erhältlich ist müssen 2-(3-Bromopropyl)furan und 3-Iodopropylthioacetat in jeweils einer Stufe ausgehend von Furan bzw. 3-Chloropropylthioacetat synthetisiert werden (Abb. 69).

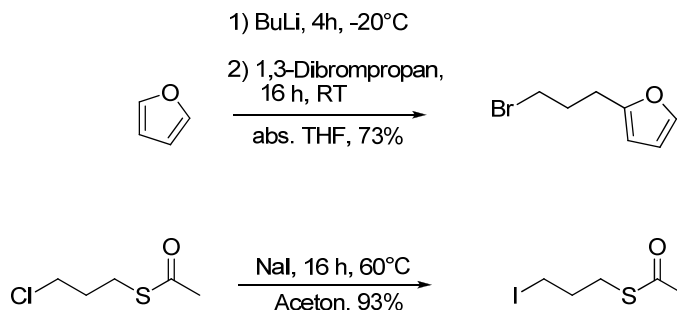


Abb. 69: Darstellung von 2-(3-Bromopropyl)furan und 3-Iodopropylthioacetat

Bei der Synthese von 2-(3-Bromopropyl)furan wird zunächst der Furan-Ring unter Verwendung von n-BuLi deprotoniert und lithiiert, anschließend wird durch Zugabe von 1,3-Dibromopropan eine nukleophile Substitutionsreaktion eingeleitet.^[244] Die Synthese von 3-Iodopropylthioacetat wird durch Umsetzung des entsprechenden Chloro-Derivates mit NaI in Aceton durch eine Finkelsteinreaktion erreicht. Die Synthesen laufen mit 73% bzw. 93% Ausbeute ab.

4.4 Zusammenfassung der Ergebnisse

Es konnte gezeigt werden, dass sich die „Mega-Stokes-Dyes“ **M1** – **M3** postsynthetisch mittels „Klick-Chemie“ an Oligonukleotide knüpfen lassen. Anhand der gemessenen Schmelztemperaturen lässt sich erkennen, dass trotz der Anknüpfung der Chromophore die Basenpaarungseigenschaften des 2'-modifizierten Uridins nicht beeinflusst werden. Die Quantenausbeute aller drei Fluoreszenzfarbstoffe steigt durch die Anknüpfung an Oligonukleotide deutlich an, die großen Stokes-Verschiebungen werden hingegen kaum beeinflusst. Somit stellen zumindest **M1** und **M2**, aufgrund ihrer relativ hohen Quantenausbeuten von 23% bzw. 33% in Oligonukleotidduplexen und ihrer großen Stokes-Verschiebungen von mehr als 100 nm, aussichtsreiche Fluoreszenzsonden für die Markierung

biologischer Proben dar. In FRET-Experimenten mit den modifizierten Oligonukleotiden konnte gezeigt werden, dass der FRET sowohl von **M1** auf **M2** als auch von **M1** auf **M3** mit hoher Effizienz funktioniert. Die höchste FRET-Effizienz wird dabei nicht etwa mit Fluorophoren in direkter Nachbarschaft, sondern bei einer Anordnung mit drei Basenpaaren zwischen Donor und Akzeptor erzielt.

Der Bodipy-Baustein **9** konnte in drei Stufen synthetisiert und mittels Phosphoramiditmethode in Oligonukleotide eingebaut werden. Durch das Bodipy-Basensurrogat **Bo** ist der Fluorophor über einen flexiblen acyclischen Linker mit der DNA verknüpft. Zunächst wurden die spektroskopischen Eigenschaften von **Bo**-markierten Oligonukleotiden untersucht, wobei festgestellt wurde, dass die Fluoreszenz in Oligonukleotiden mit Guaninen in Nachbarschaft zu **Bo** leicht verringert ist. Die Gegenbase hat dagegen keinen signifikanten Einfluss auf das Emissionsverhalten. Ebenso hat eine geänderte Konformation des chiralen acyclischen Linkers keine Auswirkungen auf die optischen Eigenschaften der **Bo**-Oligonukleotide. Es konnte gezeigt werden, dass die Art der Verknüpfung zwischen Fluorophor und DNA entscheidenden Einfluss auf die Emissionseigenschaften von Bodipy hat. Während die Emission in **BodU**-modifizierten Oligonukleotidduplexen sehr stark gelöscht ist, zeigen **Bo**-markierte Duplexe eine deutlich stärkere Fluoreszenzintensität im Vergleich zu den entsprechenden einzelsträngigen Oligonukleotiden. Bei einem Vergleich zwischen mit **Bo** und Fluorescein markierten Oligonukleotiden zeigte sich, dass **Bo** das Fluorescein in der Helligkeit um mehr als das Doppelte übertrifft. Allerdings werden die Anwendungsmöglichkeiten von **Bo** als Fluoreszenzsonde in der DNA-Analytik durch die geringe Photostabilität eingeschränkt.

Es konnten drei unterschiedlich funktionalisierte Cytidin-Derivate für die postsynthetische DNA-Modifikation nach einem relativ einfachen Syntheseverfahren und mit hohen Ausbeuten synthetisiert werden. Der Vorteil der beschriebenen Syntheseroute besteht in der breiten Anwendbarkeit, so kann sie prinzipiell für die 2'-OH-Modifikation aller vier natürlichen Nukleoside mit verschiedensten Alkylhalogeniden eingesetzt werden.

5 Metallkomplex / DNA – Konjugate mit Hydroxychinolin- und Terpyridin-Liganden

5.1 Metallkomplex / DNA – Konjugate

In den letzten 20 Jahren machten sich Wissenschaftler die einzigartigen Basenpaarungseigenschaften der DNA mehr und mehr zu nutze, um zwei- und dreidimensionale Strukturen aus DNA aufzubauen. In der Zwischenzeit lassen sich faszinierende dreidimensionale Strukturen allein durch die Auswahl der richtigen DNA-Sequenzen und deren Hybridisierung darstellen.^[5, 245] Was solchen unmodifizierten Oligonukleotidarchitekturen allerdings fehlt, ist Funktionalität.

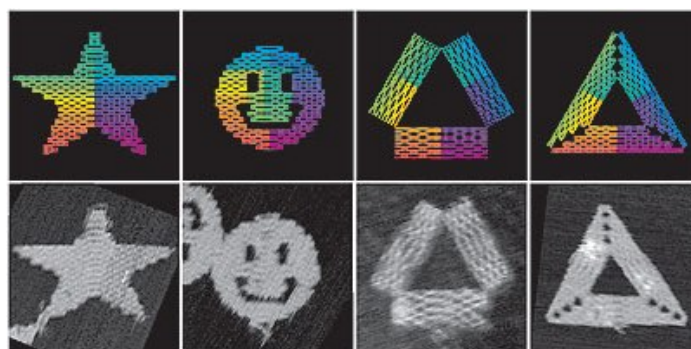


Abb. 70: DNA-Origami; obere Reihe: theoretisch erwartete Gestalt; untere Reihe: AFM Bilder der gefalteten DNA -Struktur ^[5]

Die Modifikation von DNA mit Liganden und deren Komplexierung mit Metallionen stellt eine Möglichkeit dar, um solchen DNA-Strukturen Funktionalität zu verleihen. Die entsprechenden Liganden können auf unterschiedliche Weise an Oligonukleotide angeknüpft werden. Die gängigsten Methoden sind der Ersatz natürlicher DNA-Basen durch Liganden oder deren Anknüpfung an natürliche DNA-Basen. Metallkomplexe können je nach Liganden und Zentralion photoaktiv und/oder elektroaktiv sein und magnetische und/oder katalytische Eigenschaften besitzen. In der Zwischenzeit wurden bereits verschiedene Anwendungsbereiche für Metallkomplex/DNA-Konjugate publiziert, darunter Energietransfer oder Elektronentransfer in DNA oder die Verknüpfung von Oligonukleotid-Strängen durch Komplexierung endständiger Liganden.^[77, 246, 247]

Metallionenvermittelte Basenpaare

Bereits 1963 postulierte *Katz* die Ausbildung metallionenvermittelter T-T-Basenpaare durch Komplexierung von Hg^{2+} -Ionen.^[248] Eine Möglichkeit, andere Liganden und Metallionen in Oligonukleotide zu integrieren, besteht darin, synthetisch die entsprechenden Liganden anstatt der natürlichen DNA-Basen an Ribose-Einheiten zu knüpfen (vgl. Abb. 12). Die so entstandenen neuen Nukleoside werden auch als „Ligandoside“ bezeichnet. Durch den Einbau solcher Ligandoside in Oligonukleotide lassen sich die natürlichen Basenpaare durch metallionenvermittelte Basenpaare ersetzen. Die Basenpaarung zwischen Ligandosiden kommt demnach nicht durch Wasserstoffbrückenbindungen sondern durch Komplexierung von Metallionen zustande. Da die Bindungsenergien für koordinative Metallbindungen zwischen denen für kovalente Bindungen und nicht-kovalenten Bindungen (z.B. Wasserstoffbrücken) liegen, wird die Duplexstabilität der DNA durch Austausch der natürlichen gegen metallionenvermittelte Basenpaare erhöht. Eine Reihe solcher Ligandoside wurde von verschiedenen Arbeitsgruppen synthetisiert.^[249-257]

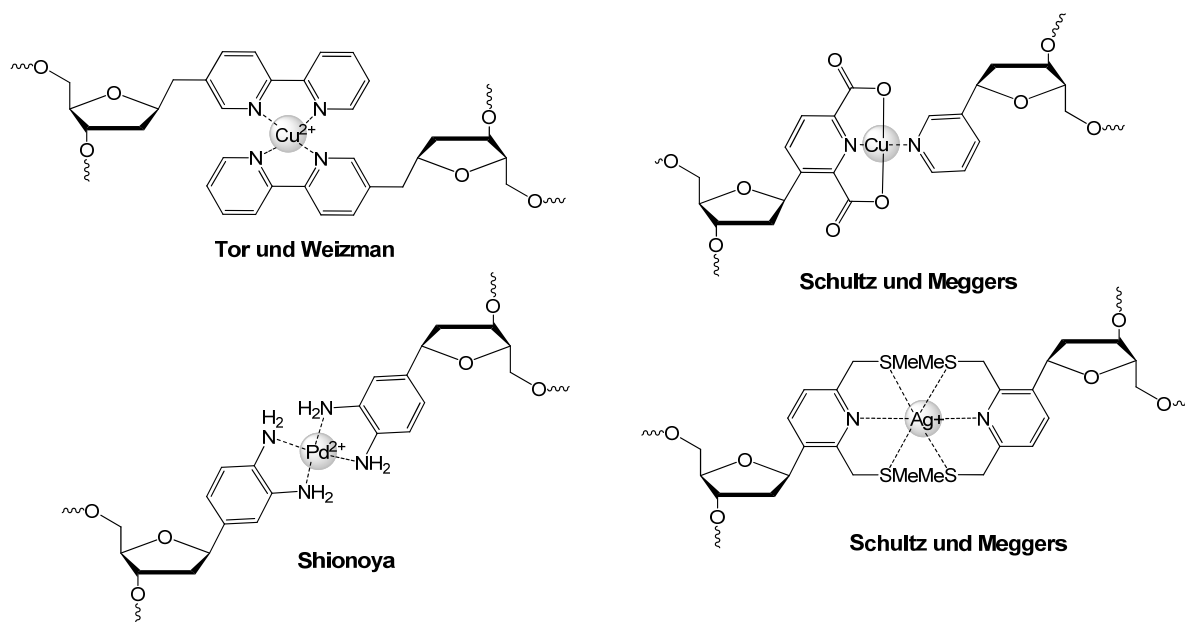


Abb. 71: Beispiele für metallionenvermittelte Basenpaare

Solche Ligandosid-Komplexe bieten die Möglichkeit zur diskreten Anordnung von Metallionen entlang der DNA-Helixachse. Somit kann die helikale DNA-Struktur als Templat für den Aufbau linearer Nanoarrays verwendet werden. Solche Nanoarrays wurden zuerst von *Shionoya et al.* untersucht.^[258] Der verwendete Hydroxypyridon-

Ligand bildet in Anwesenheit von Cu^{II} -Ionen stabile, planare und elektrostatisch neutrale Komplexe aus (vgl. Abb. 72).

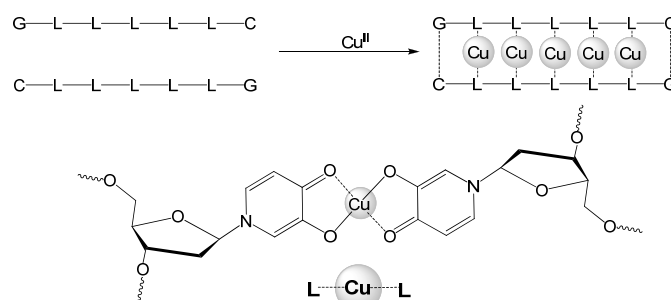


Abb. 72: Definierte Anordnung von Cu^{II} entlang der Helixachse

Die Bildung von helikalen DNA-ähnlichen Doppelsträngen wurde von *Shionoya et al.* durch UV/Vis-Spektroskopie, CD-Spektroskopie und Massenspektrometrie nachgewiesen. Es kommt zu einer Aufreihung der Cu^{II} -Ionen entlang der Helixachse und man erhält gleichmäßige Cu^{II} - Cu^{II} -Abstände. Durch ESR-Spektroskopie konnte eine ferromagnetische Kopplung zwischen den ungepaarten d-Elektronen der einzelnen Cu^{II} -Ionen nachgewiesen werden. Durch die Feinaufspaltung der ESR-Signale konnte der Cu^{II} - Cu^{II} Abstand auf 3.7 Å genähert werden, was der Distanz zwischen zwei benachbarten Basenpaaren in DNA (3.4 Å) recht nahe kommt. Die Gruppe von *Carell* konnte durch EPR-Experimente (Electron Paramagnetic Resonanz) anhand der antiferromagnetischen Kopplung von benachbarten Cu-Salen Basenpaaren ebenfalls einen Cu^{II} - Cu^{II} -Abstand 3.7 Å bestimmen.^[259]

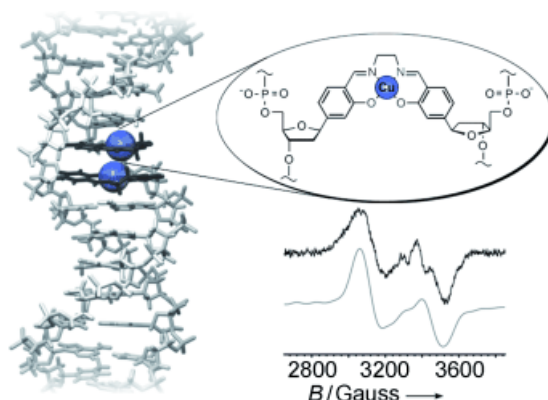


Abb. 73: Kopplung zwischen benachbarten Cu^{II} in benachbarten Cu-Salen-Basenpaaren^[259]

Carell et al. konnten auch zeigen, dass man verschiedene Metallionen an definierten Positionen entlang der Helixachse platzieren kann.^[260]

Diese Ergebnisse machen deutlich, dass metallionenvermittelte Basenpaare und die Verwendung der DNA als Strukturgerüst vielversprechende Ansätze auf dem Weg in Richtung neuer molekularer Bauteile, wie z.B. Nanodrähte, in der Nanotechnologie darstellen.^[261]

Verknüpfung von Oligonukleotiden mit Metallkomplexen

Oligonukleotide stellen aufgrund der Watson-Crick-Basenpaarung und ihrer Selbstanordnung ein wichtiges Werkzeug zum Aufbau von Nanostrukturen und Nanodevices dar.^[5, 247, 262-265] Ein Problem beim Aufbau von Strukturen, die allein auf der Selbstanordnung der DNA basieren, ist, dass eine weitere Änderung der Struktur nicht ohne weiteres möglich ist. Um neue Möglichkeiten für die DNA-Nanotechnologie zu eröffnen, ist es wichtig, die Assemblierung von Oligonukleotiden in einer reversiblen Art und Weise zu kontrollieren. Eine Möglichkeit, um dies zu erreichen ist die Verwendung von Metallkomplex / DNA - Konjugaten. Beim Aufbau von Nanostrukturen dienen die Komplexe als Verzweigungspunkte für die „Oligonukleotid-Arme“, die sich dann durch Hybridisierung mit einem passenden Gegenstrang anordnen. Die verwendeten Metallkomplexe beeinflussen die Struktur der entstehenden DNA-Architekturen durch ihre unterschiedlichen Koordinationsgeometrien (tetraedrisch, oktaedrisch, quadratisch planar oder trigonal-bipyramidale Strukturen). Außerdem kann man die Anzahl der Oligonukleotide, die durch einen Komplex koordiniert werden variieren. Mittlerweile wurden einige verschiedene Komplexe mit unterschiedlichen Geometrien an Oligonukleotide geknüpft und die Bildung von Nanoarchitekturen durch Hybridisierung untersucht. Die Bandbreite der erzeugten Strukturen reicht von einfachen linearen Anordnungen über cyclische zweidimensionale Strukturen bis hin zu dreidimensionalen Nanostrukturen.^[266-273]

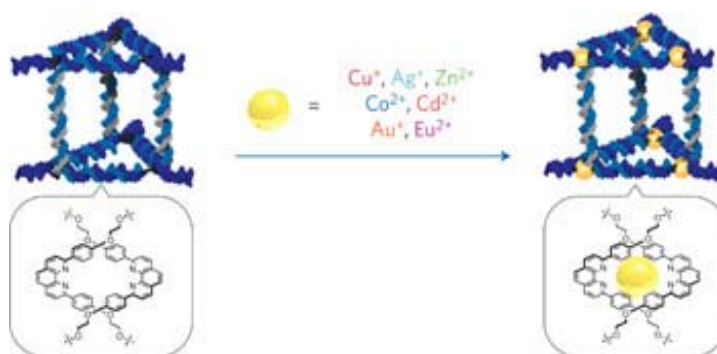
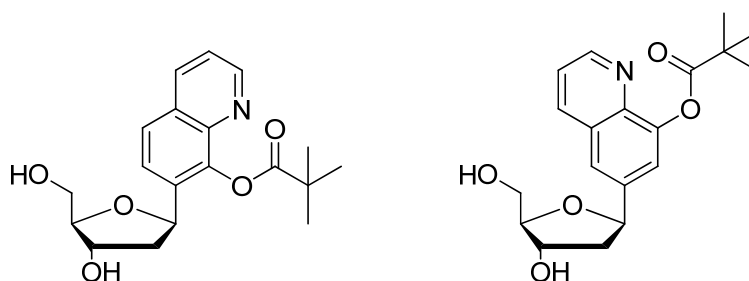


Abb. 74: Gezielter Einbau von Metallionen in Oligonukleotidarchitekturen durch *Sleiman et al.*^[267]

5.2 Hydroxychinolinvermittelte DNA-Basenpaare

Wie bereits erwähnt, wurden von verschiedenen Arbeitsgruppen bereits diverse Ligandoside synthetisiert.^[250, 252-254, 257, 274-279] Einen guten Überblick über den aktuellen Forschungsstand auf diesem Gebiet gibt ein aktueller Übersichtsartikel von *Clever und Shionoya*.^[23]

Zang et al. publizierten 2005 die Synthese eines Hydroxychinolin (HQ) -Ligandosids, welches extrem stabile Cu^{2+} -vermittelte Basenpaare ausbildet.^[280] Sie konnten zeigen, dass der Ersatz eines einzigen natürlichen Basenpaares innerhalb einer Modellsequenz durch ein Cu^{2+} -vermitteltes HQ-Basenpaar die Schmelztemperatur um mehr als 20°C erhöht. Die starke Erhöhung resultiert aus der Kombination zweier Konzepte zur Duplexstabilisierung. Zum einen hält der stabile $\text{Cu}^{\text{II}}\text{HQ}_2$ den Doppelstrang zusammen, zum anderen wird er zusätzlich durch hydrophobe Wechselwirkungen der HQs mit den DNA-Basen stabilisiert. Eine solche Stabilisierung durch hydrophobe Basenpaare wurde vorher bereits von anderen Gruppen verwirklicht.^[281-284] Basierend auf diesen Ergebnissen sollte im Rahmen dieser Arbeit ein ähnliches HQ-Ligandosid synthetisiert und der Einfluss unterschiedlicher Metallionen auf die Duplexstabilität von modifizierten Oligonukleotiden untersucht werden. Der entscheidende Unterschied zu dem in der Gruppe von Meggers verwendeten HQ-Ligandosid besteht in der Anknüpfungsposition der Riboseeinheit an den Hydroxychinolin-Liganden. Während *Zhang und Meggers* die Riboseeinheit an die 6-Position des Hydroxychinolins knüpfen, wird in dieser Arbeit eine Anknüpfung über die 7-Position durchgeführt (vgl. Abb. 75).



Zhang und Meggers

Abb. 75: Gegenüberstellung des HQ-Ligandosids aus dieser Arbeit (links) und des HQ-Ligandosids aus der Gruppe von *Meggers*.

Die Synthese des Ligandosid-Bausteins wurde im Vergleich zum Ansatz der *Meggers* Gruppe komplett verändert und stark vereinfacht. Das Syntheschema ist in Abb. 76 dargestellt. Der Schlüsselschritt der Synthese besteht in einer Pd-katalysierten Heck-Kupplung^[285] zwischen dem halogenierten Hydroxychinolin-Derivat **26** und den zweifach TBDMS-geschützten Glykal **24**. Die gewählte Synthesestrategie bietet den Vorteil, dass keine Anomerentrennung nach der Heck-Reaktion nötig ist, weil aufgrund der sterisch gehinderten Schutzgruppen ausschließlich das gewünschte β -Anomer gebildet wird.^[286]

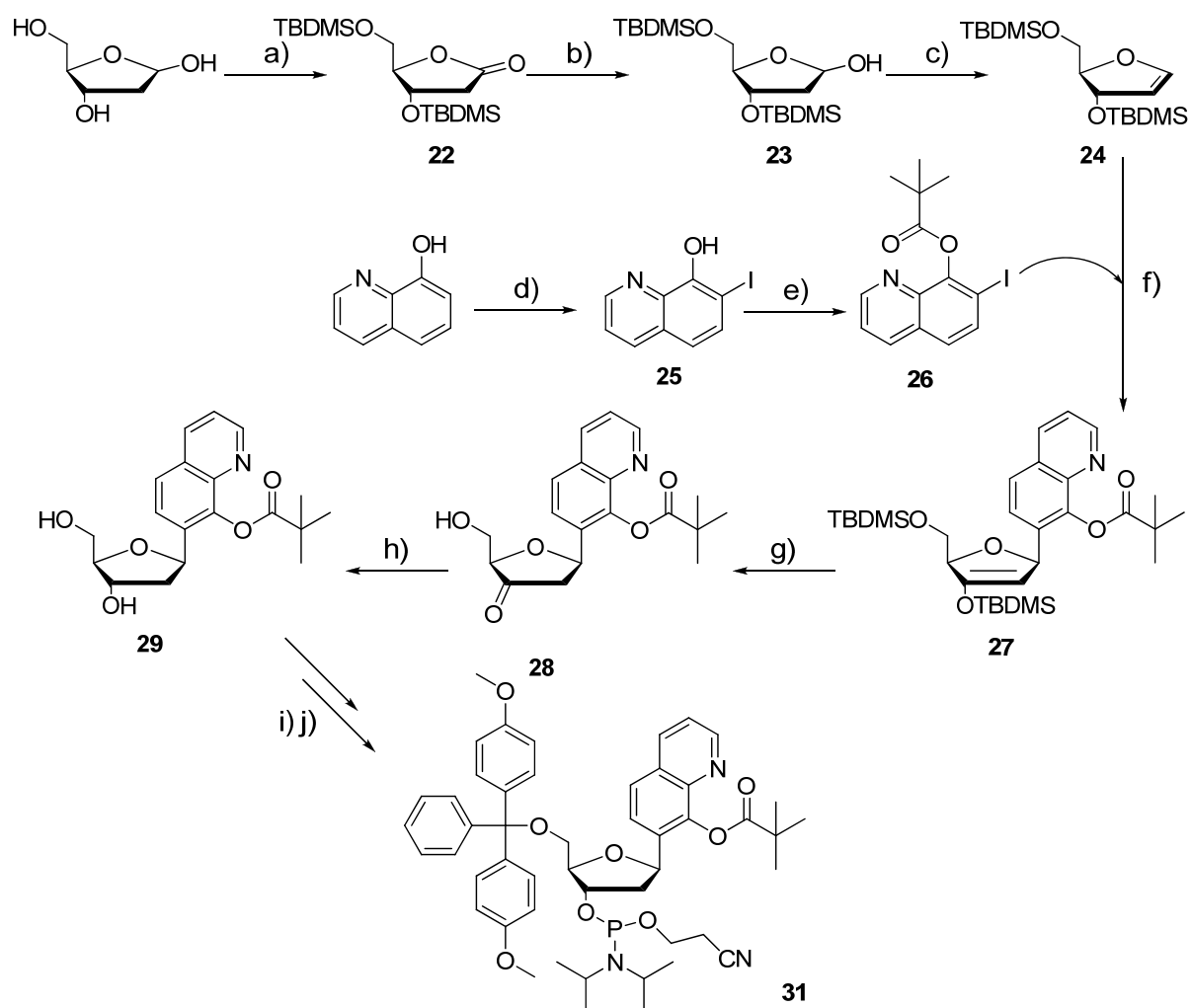


Abb. 76: Synthese des Hydroxychinolin-Phosphoramiditbausteins **31**

a) 1) Brom in H_2O , 5 Tage, RT, 2) Imidazol / TBDMSCl in DMF, 20 h, RT, 80%; **b)** DIBALH in Et_2O , 1h, -70°C , 96%; **c)** MsCl/ NEt_3 in CH_2Cl_2 , 2 h bei -60°C dann 1 h bei RT dann 16 h bei 45°C , 52%; **d)** NIS in CHCl_3 , 20 h, 40°C , 63%; **e)** Pivaloylchlorid / DMAP in Pyridin, 16 h, RT, 57%; **f)** $\text{Pd}(\text{OAc})_2$ / AsPh_3 , NEt_3 in THF, 20 h, 60°C , 73%; **g)** $\text{NEt}_3 \cdot 3\text{HF}$ in THF, 15 min bei 0°C dann 16 h bei RT, 86%; **h)** $\text{NaBH}(\text{OAc})_3$ in $\text{AcOH}/\text{CH}_3\text{CN}$, 0°C , 20 min, 76%; **i)** DMTCl in Pyridin, 48 h; RT, 62%; **j)** 2-Cyanoethoxy-*N,N*-diisopropylaminochlorophosphoramidit, DIPEA, abs. CH_2Cl_2 , 6 h, RT, 99%;

Die Synthese beginnt mit der Darstellung des Glykals **24**. Diese kann nach zwei unterschiedlichen Methoden entweder in zwei Stufen ausgehend von Thymin^[287] oder in vier Stufen ausgehend von Ribose^[286, 288] erfolgen. Beide Möglichkeiten wurden im Rahmen dieser Arbeit verwendet. In Abb. 76 ist der Ribose-Weg dargestellt, da dieser aufgrund der besseren Atomökonomie häufiger verwendet wurde. Im ersten Schritt wird D-Ribose mit Brom selektiv an der 1-Position oxidiert und anschließend nach Entfernen des Broms ohne weitere Aufarbeitung mit Imidazol und TBDMSCl versetzt. Das entstandene Lakton (**22**) wird mit DIBALH zum entsprechenden Laktol (**23**) reduziert. Durch Umsatz mit MsCl und NEt₃ wird eine Eliminierungsreaktion erreicht, die zur Ausbildung des Glykals (**24**) führt. Das für die Heck-Reaktion benötigte Hydroxychinolin-Derivat (**26**) lässt sich in zwei Stufen aus 8-Hydroxychinolin darstellen. Im ersten Schritt wird 8-Hydroxychinolin durch Umsetzung mit N-Iodsuccinimid selektiv an der 7-Position iodiert (**25**).^[289] Anschließend wird die freie OH-Gruppe mit Pivaloylchlorid geschützt (**26**). Die Heck-Reaktion zwischen **24** und **26** verläuft in abs. THF unter Verwendung von Pd(OAc)₂ als Katalysator und NEt₃ als Base. Anschließend werden die Silyl-Schutzgruppen von **27** mittels Et₃N•3HF abgespalten und es entsteht **28**. Die Reduktion zum Ligandosid **29** erfolgt stereoselektiv durch NaBH(OAc)₃.^[286] Die DMT-Schätzung der 5'-OH-Gruppe von **29** und die Umsetzung zum Phosphoramiditbaustein **31** verlaufen standardmäßig unter Verwendung von DMTCl bzw. 2-Cyanoethoxy-*N,N*-diisopropylaminochlorophosphoramidit unter basischen Bedingungen. Die Pivaloyl-Schutzgruppe wird nicht abgespalten, sie wird für die DNA-Festphasensynthese benötigt und gleichzeitig mit den basenlabilen Schutzgruppen der Nukleobasen entfernt.

Der Einbau des Sonderbausteins in Oligonukleotide erfolgte während der automatisierten Festphasensynthese unter Verwendung einer 0.1 M Lösung des Phosphoramidit-Bausteins in Acetonitril und einer auf 500 s verlängerten Kopplungszeit. Die Aufreinigung der Oligonukleotide erfolgte durch RP-HPLC unter Zusatz von 0.1 mM EDTA zum verwendeten NH₄OAc-Puffer und anschließender zweimaliger Entsalzung über Größenausschlusschromatographie, um das EDTA wieder abzutrennen. Die synthetisierten Oligonukleotidsequenzen sind in Abb. 77 dargestellt.

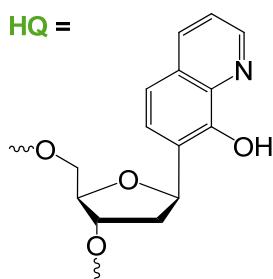


Abb. 77: Übersicht über die Hydroxychinolin-modifizierte Oligonukleotide **HQ1 – HQ6**

Zunächst sollte überprüft werden, ob es durch Zugabe von KAuCl_4 bzw. CuCl_2 zu den hydroxychinolinmodifizierten Duplexen **HQ1/HQ4**, **HQ2/HQ5** und **HQ3/HQ6** zur Ausbildung stabiler metallionenvermittelter Basenpaare kommt. Dazu wurden die komplementären HQ-Stränge jeweils in Anwesenheit von EDTA ($c = 10 \mu\text{M}$), sowie in Anwesenheit von 1.5 (**HQ1/HQ4**), 3.0 (**HQ2/HQ5**) bzw. 4.0 (**HQ3/HQ6**) Äquivalenten Metallsalz hybridisiert und die Schmelztemperaturen bestimmt. Die erhaltenen Schmelzkurven für den Duplex **HQ1/HQ4**, in dem ein natürliches Basenpaar durch ein HQ-Basenpaar ersetzt ist, sind in Abb. 78 dargestellt.

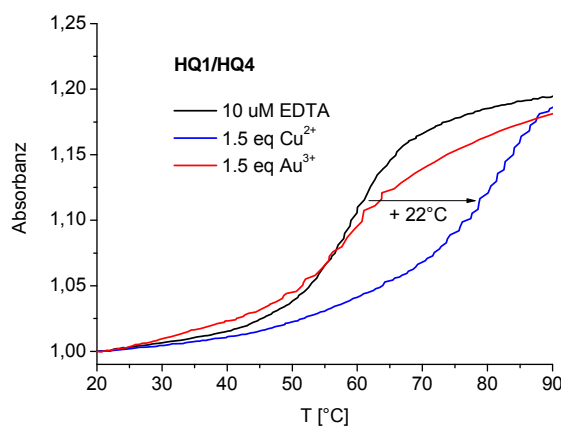


Abb. 78: Schmelzkurven für den Duplex **HQ1/HQ4** in Anwesenheit von EDTA (schwarz), 1.5 eq. CuCl_2 (rot) und 1.5 eq. KAuCl_4 (grün).

Aus Abb. 78 erkennt man, dass die Schmelztemperatur der mit Cu^{2+} versetzten **HQ1/HQ4**-Probe gegenüber der mit EDTA versetzten Probe um mehr als 20°C erhöht ist. Durch die Zugabe von Au^{3+} erhöht sich die Schmelztemperatur hingegen nicht signifikant und es kommt lediglich zu einem etwas abgeflachten Kurvenverlauf. Im Vergleich zum Referenzduplex, indem das HQ-Basenpaar durch ein AT-Basenpaar ersetzt ist kommt es in Abwesenheit von Metallionen lediglich zu einer Destabilisierung von 1.0°C . Das bedeutet, dass die Hydroxychinolinreste auch ohne Metallionen und allein durch hydrophobe Wechselwirkungen einen beträchtlichen Beitrag zur Duplexstabilität leisten. Der mit 1.5 eq. CuCl_2 versetzte **HQ1/HQ4**-Duplex hat einen um mehr als 20°C höheren T_m -Wert gegenüber dem Referenzduplex, was sich durch den stabilen Cu-Komplex begründen lässt. Diese Beobachtungen decken sich sehr gut mit den Ergebnissen von *Zhang und Meggers* ^[280] obwohl ein direkter Vergleich durch die unterschiedlichen Modellsequenzen und Messbedingungen eher schwierig ist.

Abb. 79 zeigt die Schmelzkurven aller drei HQ-Duplexe in Anwesenheit von Au^{3+} (links) und Cu^{2+} (rechts). Wie bereits für **HQ1/HQ4** erläutert, kommt es durch Zugabe von Au^{3+} zu einem Abflachen der Schmelzkurven. Dies ist mit steigender Zahl an HQ-Modifikationen stärker ausgeprägt, so dass keine T_m -Werte mehr bestimmt werden können. Die mit Cu^{2+} versetzten **HQ2/HQ5** bzw. **HQ3/HQ6**-Proben sind derart stabilisiert, dass die Schmelztemperaturen nicht ermittelt werden konnten. Die T_m -Werte sind aber im Vergleich zu den entsprechenden AT-Referenzduplexen definitiv um mehr als 20°C erhöht.

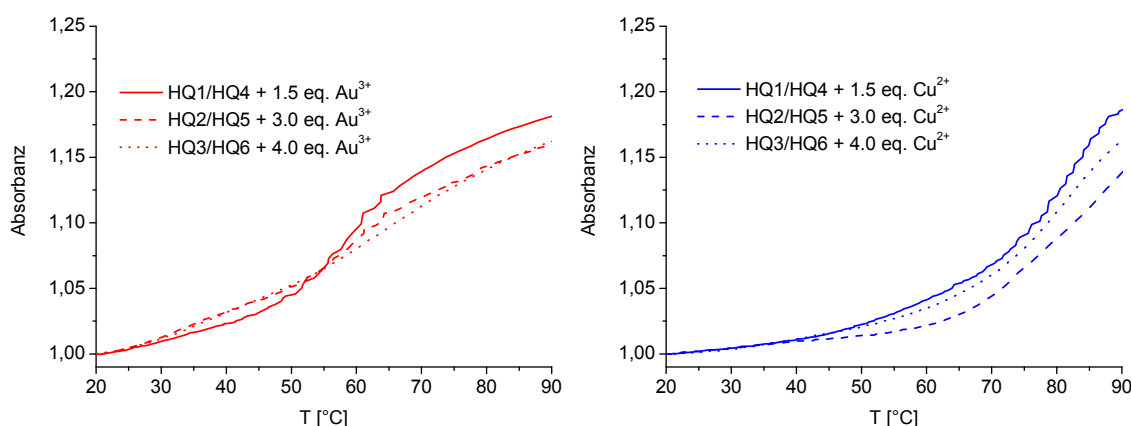


Abb. 79: Schmelzkurven der mit Au^{3+} (links) und Cu^{2+} (rechts) versetzten HQ-modifizierten Duplexe **HQ1/HQ4**, **HQ2/HQ5** und **HQ3/HQ6**.

Die Ergebnisse aus den T_m -Messungen sind in Tabelle 8 noch einmal zusammengefasst. Die ΔT_m -Werte beziehen sich jeweils auf die entsprechenden Oligonukleotid-Duplexe mit AT-Basenpaaren anstelle der Hydroxychinolin-Modifikationen.

Tabelle 8: Übersicht der T_m -Werte und ΔT_m -Werte der unterschiedlichen HQ-Oligonukleotide

Duplex	T_m [°C]	ΔT_m [°C]
HQ1/HQ4 + 4 eq. EDTA	58.0	- 1.0
HQ1/HQ4 + 1.5 eq. Cu^{2+}	80.0	+ 21.0
HQ1/HQ4 + 1.5 eq. Au^{3+}	58.1	- 0.9
HQ2/HQ5 + 4 eq. EDTA	57.6	- 3.4
HQ2/HQ5 + 3 eq. Cu^{2+}	n.d.	> + 20.0
HQ2/HQ5 + 3 eq. Au^{3+}	n.d.	---
HQ3/HQ6 + 4 eq. EDTA	59.3	- 2.1
HQ3/HQ6 + 4 eq. Cu^{2+}	n.d.	> + 20.0
HQ3/HQ6 + 4 eq. Au^{3+}	n.d.	---

Um zu untersuchen, ob die Komplexierung der entsprechenden Metallionen auch direkt durch Absorptions- oder Fluoreszenzspektroskopie verfolgt werden kann, wurden entsprechende Messungen durchgeführt. Auf die Fluoreszenzmessungen wird hier nicht näher eingegangen, da sowohl die mit EDTA versetzten Proben als auch die mit Cu^{2+} bzw. Au^{3+} versetzten Proben so gut wie keine Emission zeigen. Die Absorptionsspektren der dreifach mit Hydroxychinolin modifizierten **HQ3/HQ6** Duplexe mit EDTA, Cu^{2+} und Au^{3+} sind in Abb. 80 dargestellt.

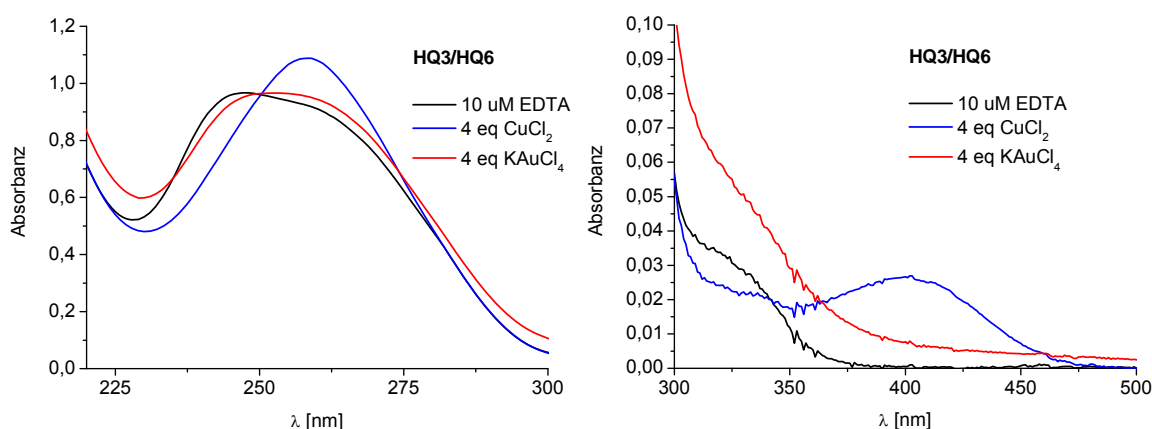


Abb. 80: Absorptionsspektren der dreifach mit HQ modifizierten Duplexe **HQ3/HQ6** in Anwesenheit von 4 eq EDTA, 4 eq Cu^{2+} und 4 eq Au^{3+} .

Im Bereich um $\lambda = 250$ nm erkennt man bei den EDTA-Proben eine deutliche Verzerrung und eine Verschiebung des Maximums der DNA-Bande. Dies wird durch die Absorption des freien Hydroxychinolins ($\lambda_{\text{max}} = 242$ nm) verursacht. Bei den Au^{3+} -Proben ist die Verzerrung etwas weniger ausgeprägt. Die Cu^{2+} -Proben zeigen im Vergleich eine höhere Absorption im Bereich von $\lambda = 258$ nm und ein bathochrom verschobenes Maximum, was auf die Bildung des Cu-Komplexes hindeutet. Die gleichen Effekte lassen sich auch für die **HQ1/HQ4** und **HQ2/HQ5**-Duplexe erkennen, allerdings sind sie dort aufgrund der geringeren Anzahl an Modifikationen schwächer ausgeprägt.

Noch deutlicher wird der Einfluss der Komplexbildung auf das Absorptionsverhalten bei Betrachtung des Absorptionsspektrums im Wellenlängenbereich $\lambda = 300$ nm – 500 nm. Hier erkennt man für die mit Au^{3+} versetzten Proben einen deutlichen Anstieg der Absorption, der aufgrund fehlender Literaturdaten allerdings nicht direkt dem Komplex zugeordnet werden kann. Für die mit Cu^{2+} versetzten Proben lässt sich eine deutliche Bande im Bereich von $\lambda = 400$ nm erkennen, dies entspricht der Absorptionsbande des $\text{Cu}^{\text{II}}\text{HQ}_2$ -Komplexes.^[290]

5.3 Verknüpfung von DNA-Strängen durch terpyridinmodifizierte Uridine

Wie bereits erwähnt, ist es möglich, verschiedene Oligonukleotid-Duplexe durch Metallkomplexbildung zu verbrücken. Allerdings sind solche Verbrückungen bisher ausschließlich terminal möglich. Ein Ligand, der dabei häufig verwendet wird, ist Terpyridin. *McLaughlin et al.* waren die ersten, die eine Konjugation zweier Oligonukleotide über terminale Terpyridin-Liganden und deren Komplexbildung mit Ru^{II} publizierten.^[291] Ein Überblick über weitere Arbeiten auf diesem Gebiet, die von den Arbeitsgruppen von *Han*, *Krämer* und *Wengel* durchgeführt wurden, ist in Abb. 81 dargestellt.

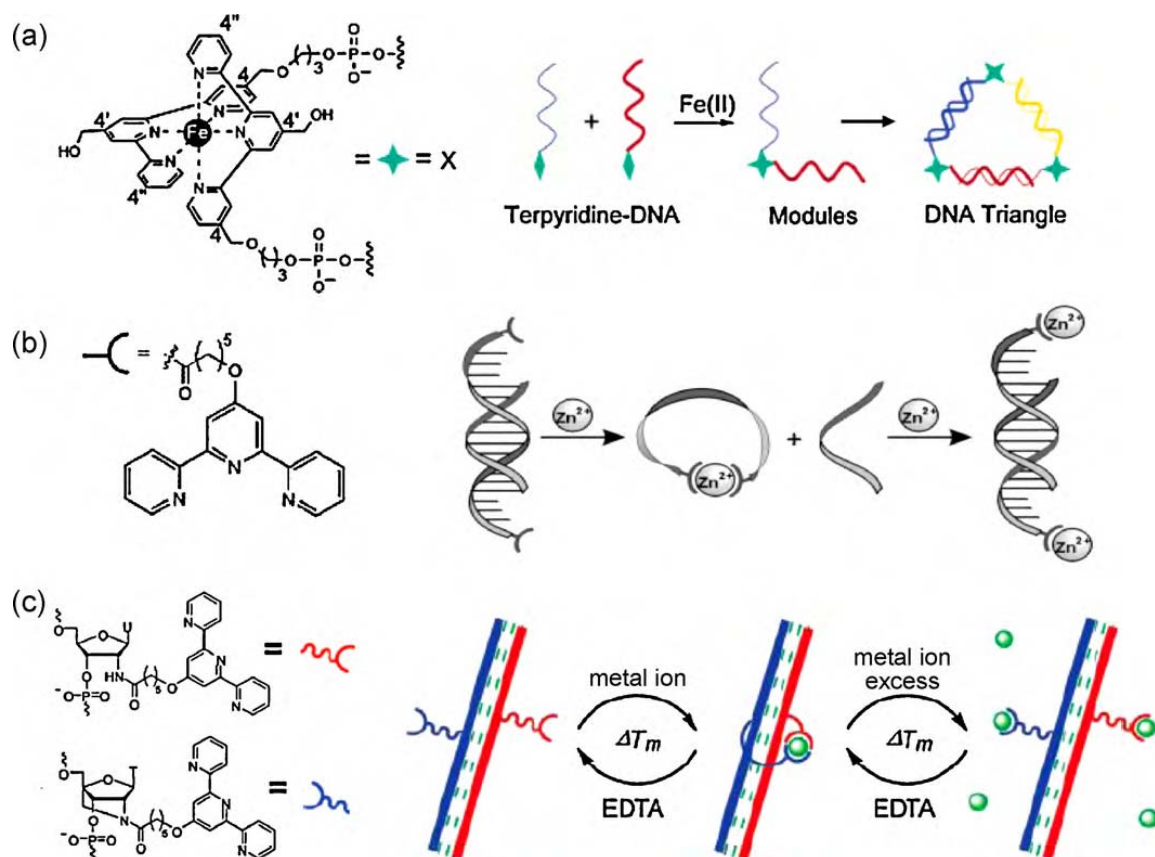


Abb. 81: Übersicht über Terpyridin-modifizierte DNA-Konjugate: **a)** Aufbau eines DNA-Dreiecks mit Terpyridin- Fe^{II} -Komplexen als Verzweigungspunkte. **b)** Durch Zn^{II} lassen sich an beiden Enden mit Terpyridin funktionalisierte Oligonukleotide cyclisieren und wieder öffnen. **c)** Metall-Komplexierung durch Terpyridin-modifizierte 2'-Amino-DNA und 2'-Amino-LNA. ^[292]

Die Gruppe von *Han* konnte zeigen, dass es durch die richtige Wahl der Oligonukleotidsequenzen mit terminalen Terpyridin-Liganden zur Ausbildung von DNA-Dreiecksstrukturen kommen kann. Dabei bilden die Metallkomplexe jeweils die Ecken der Dreiecke.^[270] Diese Arbeit stellt auch das erste Beispiel für eine geordnete Überstruktur dar, die durch eine Verbrückung von Oligonukleotiden durch Metallkomplexe erreicht wurde. *Krämer et al.* konnten zeigen, dass ein an beiden Enden mit Terpyridin-Liganden modifiziertes Oligonukleotid nach Zugabe von Zn^{II} oder Fe^{II} cyclisieren kann, selbst wenn es mit einem partiell komplementären Strang hybridisiert ist.^[293] *Wengel et al.* zeigten, dass es in, an der 2'-Position mit Terpyridin modifizierter 2'-Amino-DNA und 2'-Amino-LNA zu einer Bindung von Metallionen kommen kann. Sind beide Stränge eines Oligonukleotid-Duplex mit Liganden modifiziert, so kommt es durch Zugabe von Metallionen zu einer zusätzlichen Verknüpfung der beiden Stränge und die Schmelztemperatur nimmt zu.^[294]

Alle diese bisherigen Arbeiten verwenden lange, flexible Linker um die Terpyridin-Liganden an die DNA anzuknüpfen. Außerdem wird in keiner der bisherigen Arbeiten auf die intrinsische Absorption und Emission der unkomplexierten Terpyridin-Liganden und die Veränderung der optischen Eigenschaften durch Komplexbildung eingegangen. Es war bislang auch nicht möglich, zwei Duplexe „side on“ über Metallkomplexbildung zu verknüpfen.

Im Rahmen dieser Arbeit sollte der Terpyridin Ligand möglichst rigide an eine DNA-Base geknüpft werden und die Koordination unterschiedlicher Duplexe „end on“ sowie „side on“ optisch untersucht werden. Die Anknüpfung des Liganden sollte in einer Weise erfolgen, die eine elektronische Kopplung zwischen Terpyridin-Ligand bzw. –Komplex und dem DNA-Basenstapel ermöglicht. Eine solche Kopplung wäre für Anwendungen in der Nanoelektronik unabdingbar, da es nur so möglich ist, Elektronen von einem DNA-Doppelstrang über den Terpyridin-Komplex in einen anderen DNA-Doppelstrang zu übertragen.

Um diese Voraussetzungen zu erfüllen, wurde der Terpyridin-Ligand über eine Acetylen-Brücke an die 5-Position eines Uridins geknüpft. Das entsprechende terpyridinmodifizierte Uridin (**TerpdU**) wurde bereits in der Gruppe von *Hocék* in ähnlicher Weise synthetisiert und publiziert.^[295] Allerdings wurde das Molekül von dieser Gruppe nicht über Festphasensynthese in Oligonukleotide eingebaut und demnach auch keinerlei Eigenschaften in DNA untersucht.

Das Zielmolekül, sowie die unterschiedlichen Arten der Oligonukleotidverknüpfung sind in Abb. 82 dargestellt.

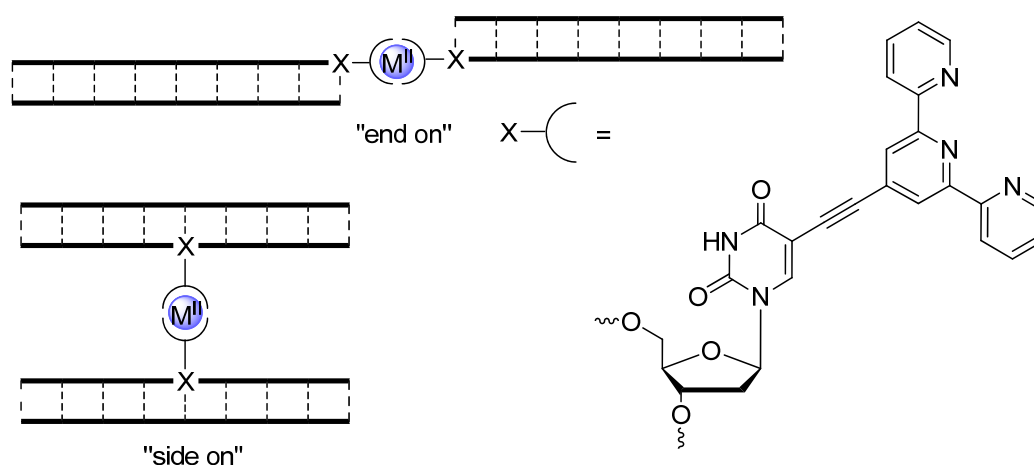


Abb. 82: „Side on“ und „end on“ Verknüpfung von Oligonukleotid-Duplexen durch in 5-Position mit Terpyridin modifizierte Uridine

5.3.1 Synthese des Terpyridin-dU Bausteins

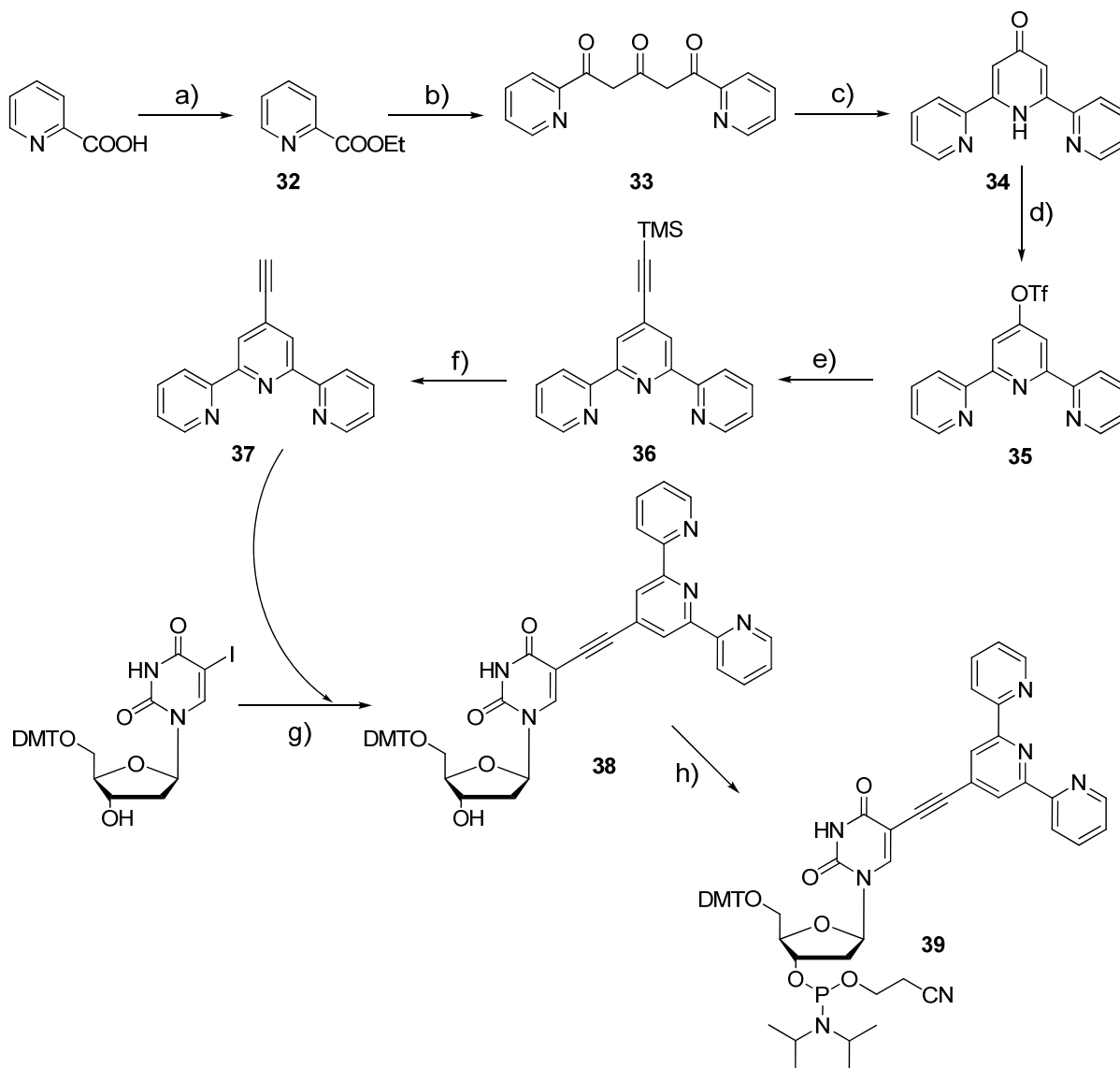


Abb. 83: Synthese des TerpdU-Phosphoramiditbausteins

a) EtOH/H₂SO₄, ü.N., Rückfluss, 61%; **b)** Aceton, NaOMe in THF, 5h, Rückfluss, 74%; **c)** NH₄OAc in Ethanol, 5h, Rückfluss, 71%; **d)** Tf₂O in Pyridin, 30min bei 0°C dann 48h bei 25°C, 72%; **e)** TMS-Acetylen, Pd(PPh₃)₂Cl₂, CuI, NEt₃ in THF, 3h, 60°C, 63%; **f)** KF in THF/MeOH, ü.N., RT, 83%; **g)** Pd(PPh₃)₂Cl₂, CuI, NEt₃ in THF, 5h, 60°C, 57%; **h)** 2-Cyanoethoxy-*N,N*-diisopropylaminochlorophosphoramidit (4 eq.), DIPEA (5 eq.), abs. DCM, 24h, RT, 99%;

Die Synthese von 4'-Ethynyl-2,2':6',2''-terpyridin (**37**) ist bekannt und wurde nach Literaturvorschriften durchgeführt.^[296-298] Dabei findet im ersten Schritt eine säurekatalysierte Veresterung von Picolinsäure statt. Der entstandene Picolinsäureethylester (**32**) wird unter stark basischen Bedingungen mit Aceton umgesetzt, wodurch **33** entsteht. Im dritten Schritt wird durch NH₄OAc ein

Ringschluss induziert und **34** als Produkt erhalten. Durch Umsetzung mit Tf_2O in Pyridin bildet sich das 4'-substituierte Terpyridinderivat **35**. Dieses wird in einer Sonogashira-Kupplung mit TMS-Acetylen umgesetzt. Die Abspaltung der Silyl-Schutzgruppe von **36** erfolgt durch KF, wodurch 4'-Ethynyl-2,2':6',2''-terpyridin (**37**) erhalten wird. Dieses wird wiederum durch Sonogashira-Kupplung mit 5'-geschütztem 5-Iodo-2'-deoxyuridin^[299] verknüpft (**38**). Die Synthese des Phosphoramidit-Bausteins (**39**) wird durch Umsetzung von **38** mit 2-Cyanoethoxy-*N,N*-diisopropylaminochlorophosphoramidit unter basischen Bedingungen erreicht. Das entsprechende Syntheschema ist in Abb. 83 dargestellt.

5.3.2 Terpyridinmodifizierte Oligonukleotide

Der Einbau des Sonderbausteins in Oligonukleotide erfolgte während der automatisierten Festphasensynthese unter Verwendung einer 0.1 M Lösung des Phosphoramidit-Bausteins in Acetonitril und einer auf 500 s verlängerten Kopplungszeit. Um die optischen Eigenschaften von **TerpdU** in DNA zu untersuchen wurden die Oligonukleotide **Terp1** – **Terp6** synthetisiert.

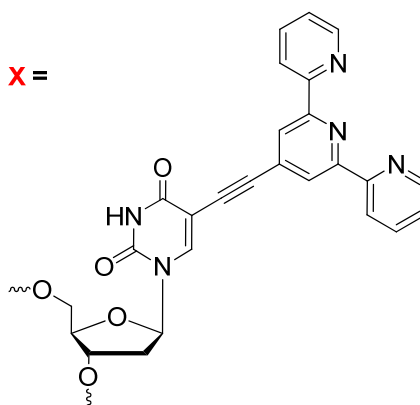
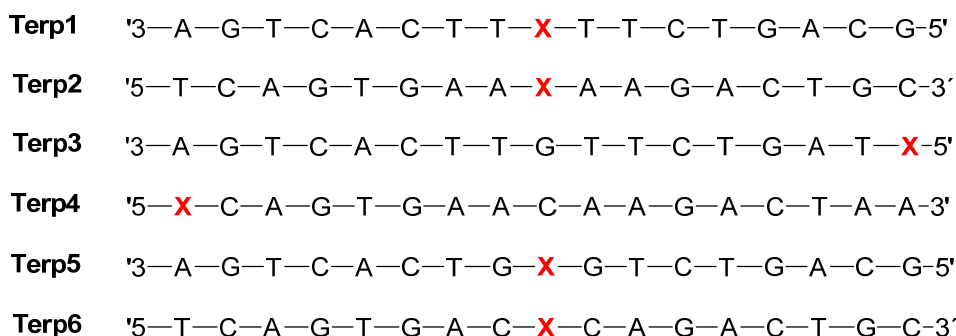
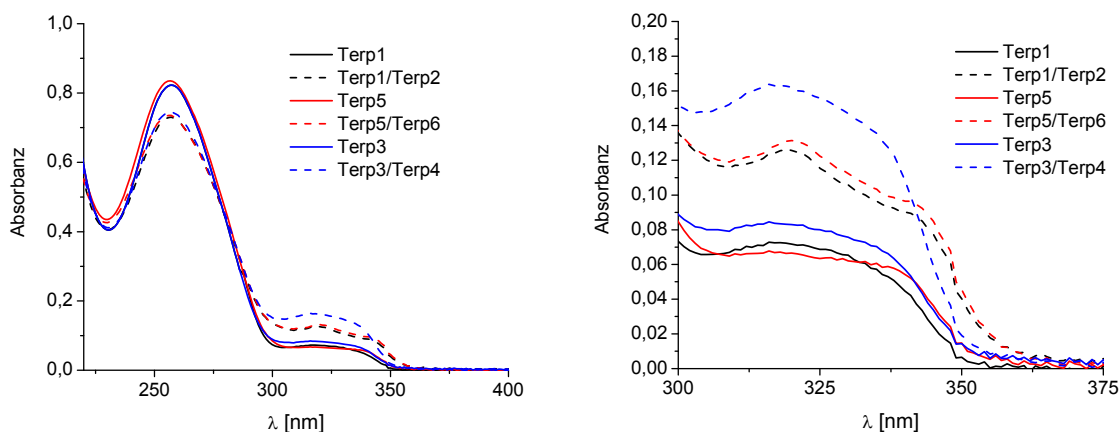


Abb. 84: Übersicht über die Terpyridin-modifizierten Oligonukleotide **Terp1-Terp6**

Die Oligonukleotide **Terp1** und **Terp2**, **Terp3** und **Terp4**, sowie **Terp5** und **Terp6** sind jeweils komplementär. **Terp1** und **Terp5** unterscheiden sich jeweils in den Nachbarbasen. **Terp3** und **Terp4** sind terminal modifiziert.

Um sicher zu gehen, dass die optischen Eigenschaften der metallfreien Oligonukleotide nicht durch Spuren von Metallen verfälscht werden, wurden die metallfreien Proben mit EDTA versetzt ($c = 100 \mu\text{M}$). Soweit nicht anders angegeben, wurden immer vollständig komplementäre Gegenstränge verwendet, bei denen A als Gegenbase des modifizierten Bausteins diente. Alle gezeigten Messungen wurden an Oligonukleotid-Duplexen durchgeführt.

In den Absorptionsspektren von **Terp1**, **Terp2** und **Terp3** lassen sich keine wesentlichen Unterschiede erkennen, die auf eine unterschiedliche Grundzustandwechselwirkung mit der DNA aufgrund der geänderten Nachbarbasen bzw. der geänderten Position schießen lassen (vgl. Abb. 85). Die Maxima der Terpyridin-Absorption liegen jeweils bei $\lambda_{\text{max}} = 316 \text{ nm}$. Das Absorptionsspektrum von **Terp3/Terp4** entspricht im Wesentlichen dem von **Terp3**, nur mit der doppelten Absorbanz durch das zweite Terpyridin im Gegenstrang. Bei den Spektren von **Terp1/Terp2** und **Terp5/Terp6** ändert sich die Form des Spektrums deutlich und es tritt zusätzlich zum Maximum bei $\lambda_{\text{max}} = 321 \text{ nm}$ noch eine Schulter bei $\lambda = 342 \text{ nm}$ auf. Dies deutet auf veränderte Grundzustandswechselwirkungen mit der DNA hin. Eine mögliche Erklärung dafür ist der Verlust der Basenpaarung beim Übergang vom unmodifizierten Gegenstrang (A als Gegenbase) zum modifizierten Gegenstrang (**TerpdU** als Gegenbase). Eine zweite wahrscheinlichere Erklärung ist die Ausbildung eines hydrophoben Terpyridin-Basenpaars. Diese wird durch die bathochrome Verschiebung des Absorptionsmaximums und den hypochromen Effekt im Bereich der Terpyridin Absorption gestützt.



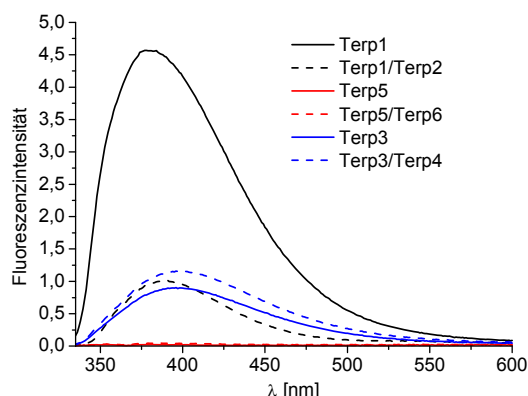


Abb. 85: Absorption- und Emissionsspektren ($\lambda_{\text{ex}} = 325 \text{ nm}$) der Oligonukleotide **Terp1-Terp3**, sowie **Terp1/Terp2**, **Terp3/Terp4** und **Terp5/Terp6**.

Die Emissionsbanden der terpyridinmodifizierten Oligonukleotide unterscheiden sich deutlich voneinander. **Terp1** zeigt ein Emissionsmaximum bei $\lambda_{\text{max}} = 378 \text{ nm}$. Das Emissionsmaximum der zugehörigen doppelt modifizierten Duplexes **Terp1/Terp2** zeigt ein leicht bathochrom verschobenes Maximum bei $\lambda = 390 \text{ nm}$. Es fällt auf, dass die Emission im Vergleich zu **Terp1** deutlich verringert ist. Die Oligonukleotide mit benachbarten GC-Basenpaaren (**Terp5** und **Terp5/Terp6**) zeigen nur noch minimale Emission. Eventuell kommt es zu einer Fluoreszenzlöschung durch die photoinduzierte Oxidation der natürlichen DNA-Basen durch angeregtes Terpyridin. Das Oxidationspotential von Terpyridin im angeregten Zustand ($E_{\text{ox}}^*(\text{Terp})$) lässt sich unter Verwendung des Reduktionspotentials im Grundzustand von $E_{\text{red}}(\text{Terp}) = -1,7 \text{ V vs Ag/AgCl}^{[300]}$ (ca. -1.5 V vs NHE) und einer E_{00} -Energie von 3.54 eV mit Hilfe der Rehm-Weller-Gleichung abschätzen. Man erhält für $E_{\text{ox}}^*(\text{Terp})$ einen Wert von $+1.84 \text{ V}$. Obwohl es sich hier nur um einen genäherten Wert handelt, sollte photoangeregtes Terpyridin in der Lage sein, sowohl Guanin als auch Adenin zu oxidieren. Eine Fluoreszenzlöschung durch Ladungstransfer würde die starke Löschung der Emission von **Terp5** und **Terp5/Terp6** gegenüber **Terp1** aufgrund der unterschiedlichen Basenumgebung erklären. Die Löschung des **Terp1/Terp2**-Duplexes beruht auf einer Kombination zweier Effekte. Wie schon aus den Absorptionsspektren vermutet und durch T_m -Messungen bestätigt (Tabelle 9), kommt es zur Ausbildung eines hydrophoben Terpyridin-Basenpaars. Dadurch interkalieren beide Terpyridine in den Basenstapel und sind somit mit diesem optimal elektronisch gekoppelt. Aus dieser Anordnung heraus treten verstärkt Ladungstransferprozesse auf und die Emission wird stärker gelöscht.

Die terminal mit Terpyridin funktionalisierten Duplexe **Terp3** und **Terp3/Terp4** besitzen ein Emissionsmaximum bei $\lambda = 400$ nm. Es fällt auf, dass die Emission von **Terp3/Terp4** im Vergleich zu der von **Terp3** nur leicht erhöht ist, obwohl man durch den zusätzlichen Terpyridin-Liganden eher einen Anstieg um das Doppelte erwarten würde. Erklären lässt sich dies durch die chemische Umgebung des zweiten Terpyridins. Dieses befindet sich in Nachbarschaft eines GC-Basenpaares, was zur Verringerung der Fluoreszenz führt. Im Vergleich mit **Terp1** erkennt man, dass die Fluoreszenz für **Terp 3** deutlich verringert ist.

In Tabelle 9 sind die Absorptions- und Emissionsmaxima, sowie die Schmelztemperaturen der einzelnen Duplexe zusammengestellt.

Tabelle 9: Absorptions-, Emissionsmaxima und Schmelztemperaturen der Terpyridin-Oligonukleotide. Die ΔT_m -Werte beziehen sich jeweils auf vollständig komplementäre Referenzduplexe in denen die modifizierten Stellen durch AT-Basenpaare ersetzt sind.

Duplex	$\lambda_{\text{abs}}[\text{nm}]$	$\lambda_{\text{em}} [\text{nm}]$	$T_m [^\circ\text{C}]$	$\Delta T_m [^\circ\text{C}]$
Terp1	316	378	56.8	-5.7
Terp1/Terp2	321	390	65.9	+2.4
Terp3	316	400	61.4	---
Terp3/Terp4	316	400	62.7	---
Terp5	316	---	63.9	-4.1
Terp5/Terp6	321	---	71.6	+3.6

Aus Tabelle 9 lässt sich erkennen, dass die Schmelztemperaturen der Duplexe **Terp1** und **Terp5** gegenüber den entsprechenden unmodifizierten Referenzduplexen nur um etwa $4^\circ\text{C} - 6^\circ\text{C}$ verringert sind. Diese vergleichsweise geringe Destabilisierung lässt sich vermutlich auf eine zumindest teilweise intakte Basenpaarung des terpyridinmodifizierten Uridins mit A als Gegenbase zurückführen. Um dies zu überprüfen, wurden exemplarisch **Terp5**-Duplexe mit allen vier natürlichen Gegenbasen zum **TerpdU** synthetisiert und die T_m -Werte bestimmt. Dabei wird die Gegenbase Y jeweils direkt im Duplexnamen angegeben (**Terp5Y**). Aus den entsprechenden Werten in Tabelle 10 erkennt man, dass der Duplex **Terp5A** die höchste Schmelztemperatur aufweist. Dies unterstützt die Vermutung der teilweise intakten Basenpaarung zwischen A und **TerpdU**.

Tabelle 10: Schmelztemperaturen der **Terp5Y** Duplexe mit unterschiedlichen Gegenbasen zum TerpdU. Die ΔT_m -Werte beziehen sich auf komplett unmodifizierte Duplexe mit einem AT Basenpaar an der Stelle der TerpdU-Modifikation.

Duplex	T_m [°C]	ΔT_m [°C]
Terp5A	63.9	- 4.1
Terp5T	63.2	- 4.8
Terp5G	60.3	- 7.7
Terp5C	60.8	- 7.2

Noch auffälliger sind allerdings die stark erhöhten T_m -Werte bei in den Duplexen, in denen sich zwei **TerpdU**-Bausteine gegenüber stehen (vgl. Tabelle 9). Eine Basenpaarung über H-Brücken scheidet hier als stabilisierender Faktor aus. In der Literatur wird eine ähnliche Stabilisierung für gegenüberliegende Bispyridyl-Bausteine durch die Gruppe von *Leumann* beschrieben.^[284] Im Unterschied zur hier vorliegenden Arbeit waren die Bispyridyl-Gruppen allerdings direkt an die Riboseeinheit geknüpft. Folgt man der Interpretation von *Leumann et al.*, so kommt es in den **Terp1/Terp2**- und **Terp5/Terp6**- Duplexen zu einer Stabilisierung der Duplexstruktur durch ein hydrophobes Basenpaar. Dabei ändert sich die lokale Struktur derart, dass nicht mehr der aromatische Teil der Uridins ins Innere des Basenstapels ragt, sondern der große hydrophobe Terpyridin-Rest. Die erreichte Stabilisierung wäre durch den zusätzlichen Pyridin-Ring im Vergleich zu den Bispyridinen größer als die von *Leumann et al.* beobachtete.

5.3.3 Verknüpfung von Oligonukleotiden über Terpyridin-Komplexe

Um die Komplexbildung unterschiedlicher Metallionen zu untersuchen sowie die Komplexstöchiometrie zu bestimmen, wurden Titrationsexperimente mit unterschiedlichen Metallsalzen durchgeführt. Dabei wurden CuCl_2 , NiCl_2 , ZnCl_2 und FeCl_2 verwendet. Zwischen den einzelnen Titrationsschritten und den zugehörigen Messungen wurde jeweils 90 min gewartet, um eine ausreichende Komplexbildung zu ermöglichen. Für die Titrationen wurde jeweils die DNA-Lösung vorgelegt und eine Metallsalzlösung zu titriert. Es wurden sowohl Absorptions- als auch Emissionsmessungen durchgeführt.

Im Folgenden werden zunächst die Ergebnisse der für die Titrationsexperimente mit **Terp1** dargestellt (Abb. 86). Die Absorptionen der Cu^{2+} , Ni^{2+} und Zn^{2+} -Komplexe sind sich dabei recht ähnlich und man erkennt im Vergleich zu den metallfreien Proben eine deutliche Änderung der Absorbanz im Bereich um $\lambda = 350 \text{ nm}$. Im Falle einer Titration mit FeCl_2 ändert sich die Absorption um $\lambda = 350 \text{ nm}$ eher wenig, so dass es schwierig ist, daraus eine Aussage über die Komplexbildung zu gewinnen. Glücklicherweise zeigen $\text{Fe}(\text{tpy})_2$ -Komplexe eine charakteristische MLCT-Bande im Bereich $\lambda = 550 \text{ nm} - 600 \text{ nm}$.^[301] In den Absorptionsspektren lässt sich erkennen, dass die Absorptionsänderung bei CuCl_2 , NiCl_2 und ZnCl_2 zwischen 0.5 und 0.75 Äquivalenten Metallsalz abgeschlossen ist. Dies spricht für eine 2:1 Komplexstöchiometrie, d.h. je zwei Terpyridine komplexieren ein Zentralmetall. Für die Titration mit FeCl_2 zeigt die charakteristische MLCT-Bande die Anwesenheit des $\text{Fe}(\text{tpy})_2$ -Komplexes an, diese bildet sich allerdings erst langsam aus. Daher ist während der Titration nur ein sehr geringer Anstieg der MLCT-Bande zu erkennen und erst eine Messung nach 24 h zeigt deutlich die Bildung des $\text{Fe}(\text{tpy})_2$ -Komplexes an. Die 2:1 Komplexstöchiometrie bedeutet im Umkehrschluss, dass durch das Zentralion nicht nur zwei Terpyridine, sondern zwangsläufig auch zwei **Terp1**-Duplexe „side on“ verknüpft werden.

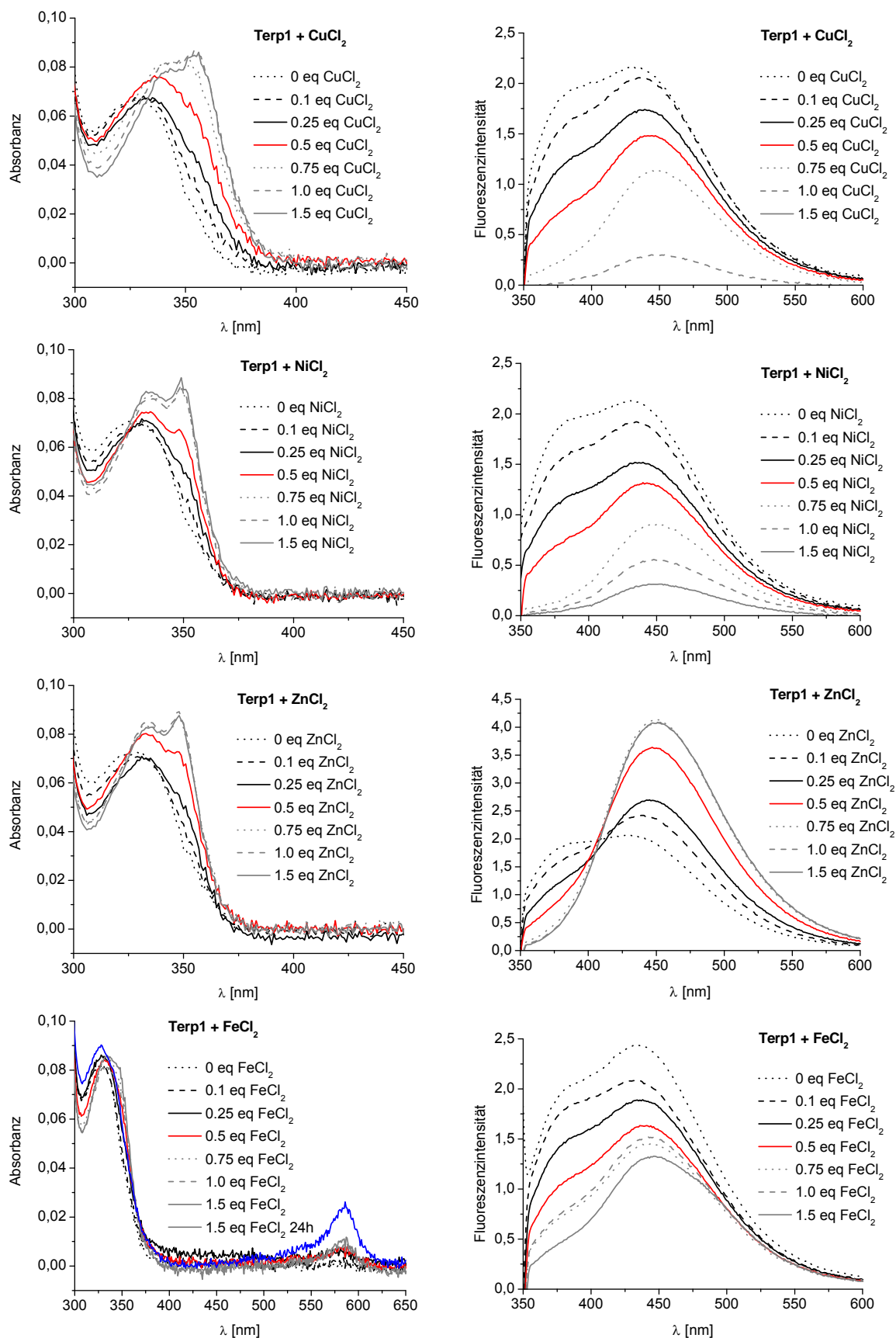


Abb. 86: Absorptions- und Emissionsspektren ($\lambda_{\text{ex}} = 345 \text{ nm}$) für die Titrationsen von **Terp1** mit CuCl₂, NiCl₂, ZnCl₂ und FeCl₂

Die während der Titrations aufgenommenen Emissionsspektren stützen die Ergebnisse aus den Absorptionsmessungen. Man erkennt in den Spektren für die Titration mit CuCl_2 , NiCl_2 und ZnCl_2 , dass sich die Form der Spektren bis zu einer Zugabe von etwa 0.5 bis 0.75 eq. Metallsalz verändert. Danach bleibt die Form der Spektren erhalten. Für CuCl_2 und NiCl_2 es kommt zu einer Fluoreszenzverringering durch Zugabe weiterer Metallionen. Im Falle von ZnCl_2 ist keine weitere Emissionsänderung zu erkennen. Der Zn(tpy)_2 -Komplex zeigt eine bemerkenswerte intrinsische Emission mit einem Maximum bei $\lambda = 450 \text{ nm}$ (Abb. 86). Es handelt sich dabei um einen LC – Phosphoreszenzübergang (LC = *ligand centered*), d.h. die Emission findet aus einem LC – Triplettzustand heraus statt.^[302, 303]

Betrachtet man die Veränderung der Fluoreszenz im Emissionsmaximum der mit EDTA versetzten **Terp1**-Probe ($\lambda_{\text{max}} = 378 \text{ nm}$) und trägt die zugehörigen Fq-Werte gegen die zugegebenen Äquivalente an Metallionen auf, so erkennt man sehr deutlich, dass bei ca. 0.7 eq. Metallionen die Fluoreszenz annähernd maximal gelöscht ist.

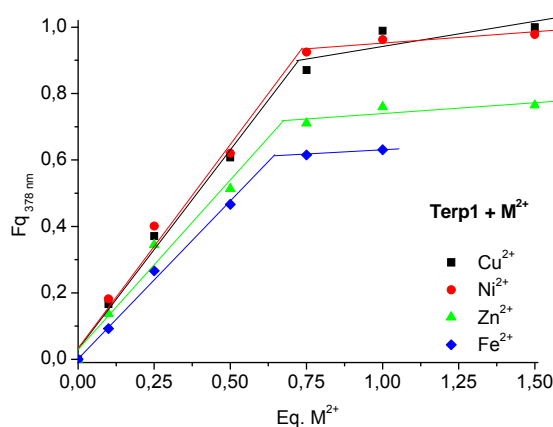


Abb. 87: Fluoreszenzlöschung von **Terp1** bei $\lambda = 378 \text{ nm}$ für Zugabe unterschiedlicher Äquivalente an CuCl_2 , NiCl_2 , ZnCl_2 und FeCl_2 ($\lambda_{\text{ex}} = 345 \text{ nm}$).

Die Emissionsspektren deuten demnach, genau wie die Absorptionsspektren, auf eine 2:1 Komplexstöchiometrie hin, in der ein Zentralmetall von zwei Terpyridin-Liganden koordiniert wird. Somit verknüpft der Komplex zwei Oligonukleotid-Duplexe „side on“. Diese Ergebnis ist deshalb sehr bemerkenswert, da in der Literatur bisher nur „end on“ Verknüpfungen unter Verwendung längerer Linker oder Verknüpfungen der beiden Stränge innerhalb desselben Duplexes beschrieben wurden.^[270, 291, 293, 294]

Um die Reversibilität der Komplexbildung und somit der Oligonukleotidverknüpfung zu untersuchen wurden die Titrationslösungen mit EDTA versetzt ($c = 100 \mu\text{M}$) und 24 h bei RT inkubiert. Danach wurden erneut Absorptionsspektren aufgenommen und mit denen einer Kontrolllösung, die nur EDTA aber keine Metallionen enthielt, verglichen (Abb. 88). Es zeigt sich, dass die Komplexbildung von Zn^{2+} vollständig reversibel verläuft und auch die Cu^{2+} -Komplexbildung größtenteils reversibel ist. Die $\text{Fe}(\text{tpy})_2$ und $\text{Ni}(\text{tpy})_2$ Komplexe werden dagegen durch die EDTA-Zugabe kaum beeinflusst. Demnach kann man je nach verwendetem Zentralmetall steuern, ob man eine reversible Komplexbildung und damit verbundene Oligonukleotidverknüpfung, oder eine irreversible Komplexbildung erhält. Diese Beobachtung steht im Einklang mit den Stabilitäten der verschiedenen $\text{M}^{\text{II}}(\text{tpy})_2$ -Komplexe. [304-306]

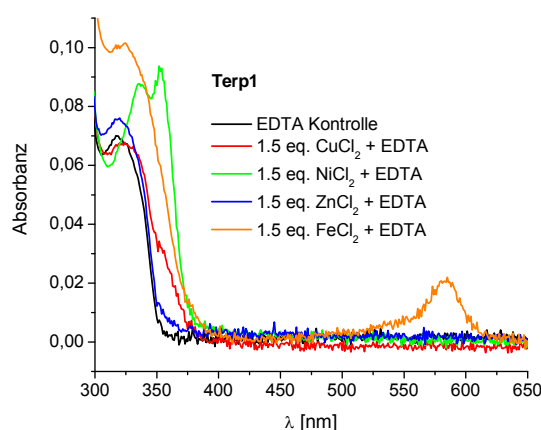


Abb. 88: Absorptionsspektren der zuerst mit 1.5 eq M^{2+} und anschließend mit EDTA ($c = 100\text{mM}$) versetzten **Terp1**-Proben

Um die „end on“-Verknüpfung von terpyridinmodifizierten Oligonukleotiden zu untersuchen wurden die gleichen Titrations wie für **Terp1** auch für die **Terp3** Duplexe durchgeführt. Die Ergebnisse entsprechen im Wesentlichen denen für **Terp1** und werden deshalb nur sehr kurz diskutiert. Man erkennt, dass in den Absorptionsspektren für die Titrations mit NiCl_2 , ZnCl_2 und FeCl_2 die Änderung nach einer Zugabe von 0.5 eq. M^{2+} abgeschlossen ist. Auch die Form der Emissionsbande verändert sich durch weitere Metallsalz-Zugabe nicht weiter. Bei CuCl_2 werden 0.75 eq. Metallsalz benötigt, um die Veränderungen im Absorptions- und Emissionsspektrum zu komplettieren (Abb. 89).

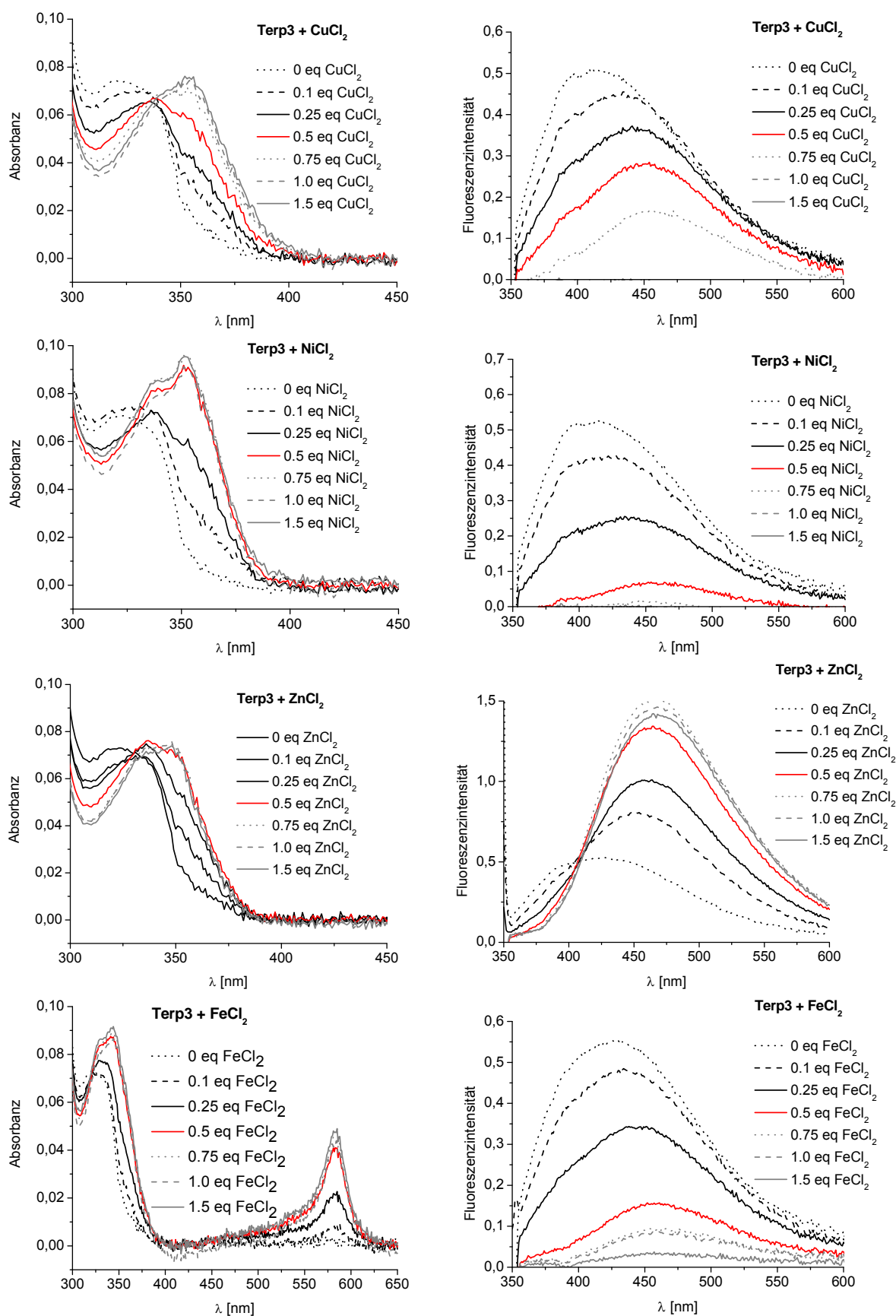


Abb. 89: Absorptions- und Emissionsspektren ($\lambda_{\text{ex}} = 345 \text{ nm}$) für die Titrations von **Terp3** mit CuCl_2 , NiCl_2 , ZnCl_2 und FeCl_2

Die Titrationsergebnisse zeigen, dass die „end on“ Koordination zweier Oligonukleotide über Terpyridin-Komplexe mit verschiedenen Metallionen funktioniert. Das neue und der entscheidende Unterschied zu den bisher durchgeführten Oligonukleotidverknüpfungen ist die rigide Verknüpfung direkt am Nukleosid ohne einen weiteren flexiblen Linker.

Trägt man die Fq-Werte im Emissionsmaximum der mit EDTA versetzten **Terp3** Probe ($\lambda_{\text{max}} = 400 \text{ nm}$) gegen die zugegebenen Äquivalente an Metallionen auf, so erkennt man sehr deutlich, dass für Ni^{2+} , Zn^{2+} und Fe^{2+} bei ca. 0.5 eq Metallionen die Emission maximal gelöscht ist. Bei den Zn^{2+} Proben wurde aufgrund der intrinsischen Fluoreszenz der Fq-Wert bei $\lambda = 390 \text{ nm}$ verwendet, da bei $\lambda = 400 \text{ nm}$ annähernd der isoemissive Punkt von freiem und komplexiertem Terpyridin erreicht ist.

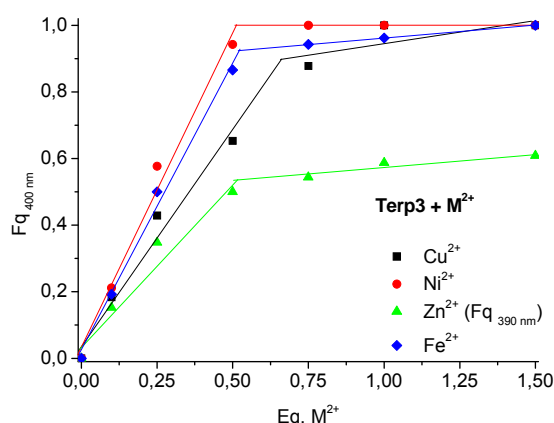


Abb. 90: Fluoreszenzlöschung von **Terp3** bei $\lambda = 400 \text{ nm}$ für Zugabe unterschiedlicher Äquivalente an CuCl_2 , NiCl_2 , ZnCl_2 und FeCl_2 ($\lambda_{\text{ex}} = 345 \text{ nm}$).

Genau wie für **Terp1** wurde auch für **Terp3** die Reversibilität der Komplexbildung durch Zugabe von EDTA untersucht. Die Ergebnisse decken sich mit denen für die EDTA Zugabe bei **Terp 1**, d.h. die Komplexbildung von Ni^{2+} und Fe^{2+} ist weitgehend irreversibel, die von Cu^{2+} und Zn^{2+} reversibel.

Um die, durch die Metall-Komplexierung entstandenen Oligonukleotid-Dimere (**Terp1-Terp1** bzw. **Terp3-Terp3**) zweifelsfrei nachzuweisen, wurden die **Terp1** bzw. **Terp3** Proben mit 0.5 eq Metallsalz versetzt und auf nicht-denaturierende 8%ige SB Whatman-Gele (Natriumborat-Puffer, pH 8) aufgetragen. Als Referenz dienten bei den Gel-Experimenten mit EDTA ($c = 100 \mu\text{M}$) versetzte Proben ohne Metallsalz.

Die Proben wurden vor dem Aufbringen auf die Gele mit Gel Star[®] - Fluoreszenzmarker versetzt um eine Fluoreszenzdetektion zu ermöglichen. Da die Fluoreszenzdetektion weniger sensitiv und relativ störungsanfällig ist wurde zusätzlich noch eine Silberfärbung der Gele vorgenommen.

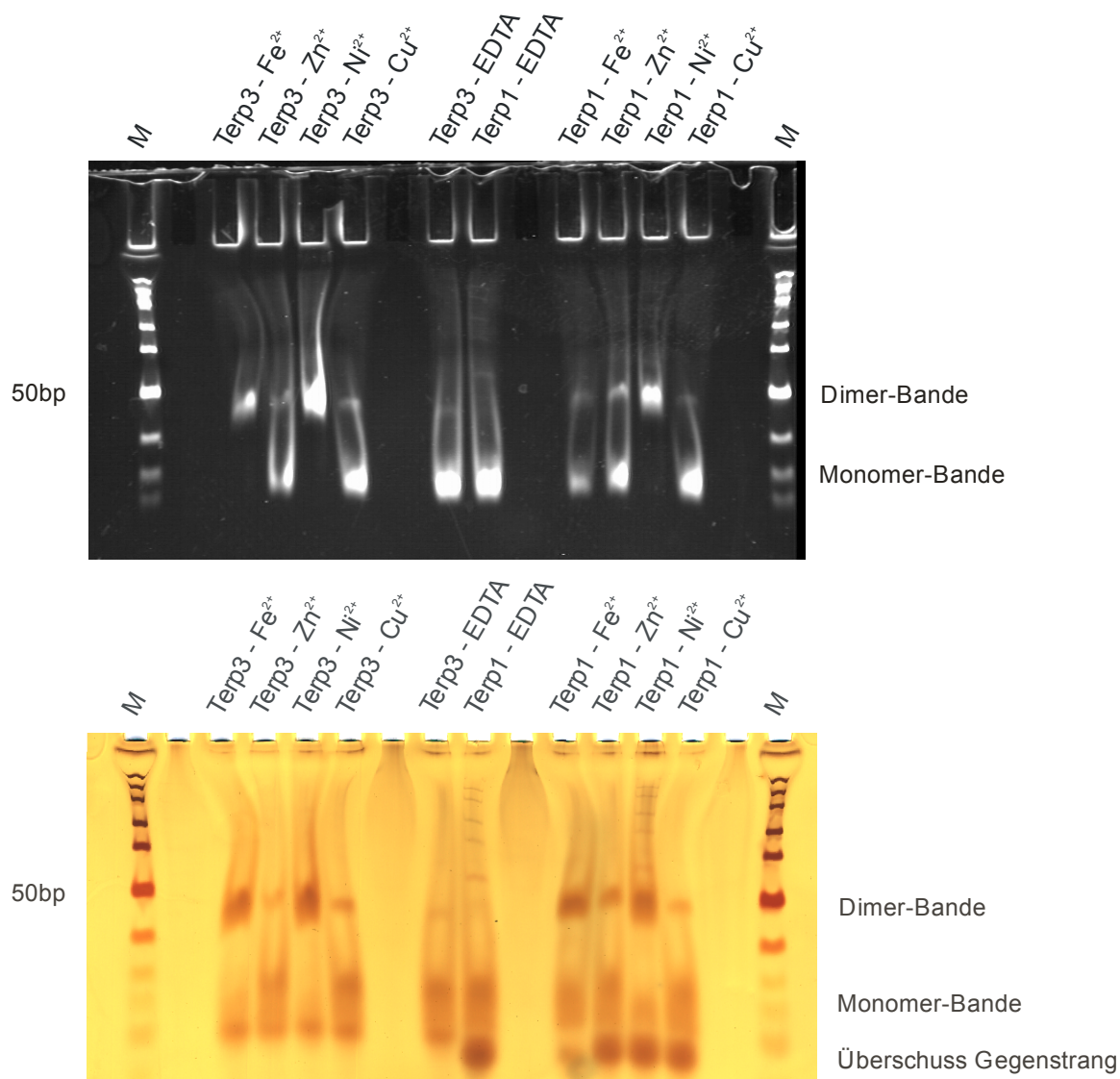


Abb. 91: Gelbilder der **Terp1** bzw. **Terp3**-Proben mit je 0.5 eq M^{2+}

Auf den Gelen erkennt man deutlich, dass die mit $NiCl_2$ versetzten Proben ausschließlich eine fluoreszente Bande zeigen, die der des **Terp1**-Dimers bzw. des **Terp3**-Dimers entspricht. Im Falle der mit $FeCl_2$ versetzten Proben lässt sich anhand der Fluoreszenzbilder nur die Bildung des **Terp3**-Dimers erkennen. Nach der Silberfärbung erkennt man jedoch eine deutliche Bande des **Terp1**-Dimers. Da die Fluoreszenz bei allen Fe^{2+} -Proben recht gering ist, kann man vermuten, dass es zu einer Löschung der Gel-Star[®] - Emission durch den $Fe(tpy)_2$ -Komplex kommt. Bei

den mit ZnCl_2 und CuCl_2 versetzten Proben ist die Dimer-Bande jeweils nur sehr schwach ausgeprägt und die Hauptbande entspricht der des Monomers (vgl. Abb. 91). Daraus lässt sich allerdings nicht schließen, dass hier keine Dimere in Lösung gebildet werden, sondern lediglich dass diese unter den Bedingungen der Elektrophorese nicht stabil sind. Diese Beobachtung deckt sich auch mit den unterschiedlichen Stabilitäten der Terpyridin-Metall-Komplexe. Ni^{2+} bildet den stabilsten $\text{M}^{\text{II}}(\text{tpy})_2$ -Komplex, der vermutlich daher auch unter den Elektrophoresebedingungen stabil ist. Fe^{2+} bildet etwas schwächere Komplexe als Ni^{2+} , aber stärkere als Cu^{2+} und Zn^{2+} . [304-306]

Nachdem gezeigt werden konnte, dass die Verknüpfung zweier Oligonukleotidduplexe zu Dimeren sowohl „end on“ als auch „side on“ funktioniert, sollten im nächsten Schritt mehrere Oligonukleotide zu größeren Konstrukten verknüpft werden. Dafür wurden die Stränge **Terp1** und **Terp2** bzw. **Terp3** und **Terp4** miteinander hybridisiert. Es wurden, wie bereits für **Terp1** und **Terp3** gezeigt, Titrationsexperimente mit Cu^{2+} , Ni^{2+} , Zn^{2+} und Fe^{2+} durchgeführt. Die erwarteten Konstrukte sind in Abb. 92 schematisch dargestellt.

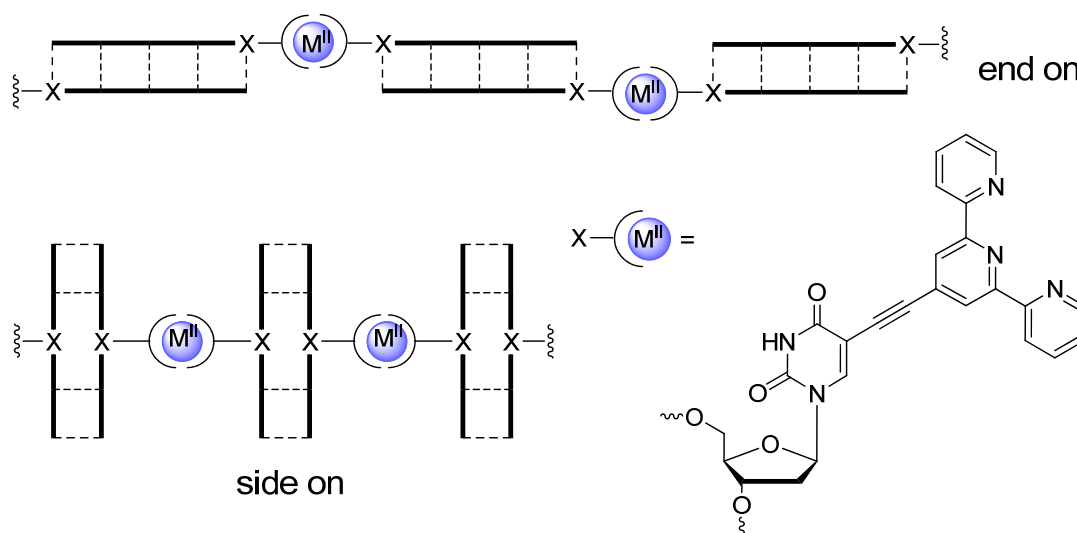
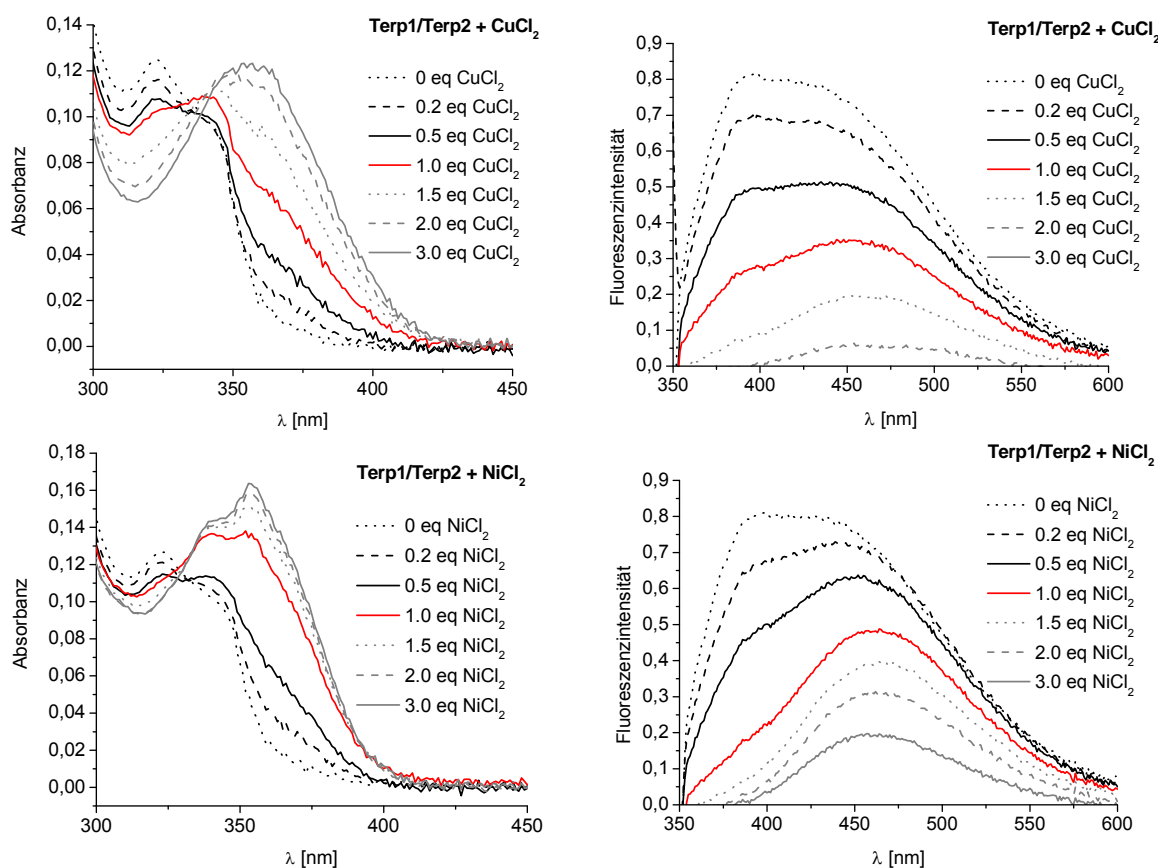


Abb. 92: Schematische Darstellung der Bildung größerer Oligonukleotidaggregate

Für den Fall einer Ausbildung größerer Oligonukleotidaggregate ergibt sich eine 2:1 Komplexstöchiometrie. Bei den Titrationsexperimenten wäre demnach eine Veränderung der Spektren bis zur Zugabe von einem Äquivalent Metallsalz zu erwarten.

Die Titrationsexperimente für die **Terp1/Terp2** Oligonukleotid-Duplexe sind in Abb. 93 dargestellt. Man erkennt in den Absorptions- und Emissionsspektren der CuCl_2 -Titration, dass erst ab zwei Äquivalenten Cu^{2+} keine deutlichen Veränderungen mehr zu sehen sind. Dies kann unterschiedliche Ursachen haben. Zum einen besteht die Möglichkeit, dass die Ausbildung der Komplexe recht langsam verläuft und deshalb in den 90 min zwischen den Titrationsschritten nicht vollständig abläuft, zum anderen ist auch eine 1:1 Komplexstöchiometrie denkbar. Dabei würde jeder Terpyridin-Ligand ein Zentralmetall komplexieren und es kommt nicht zur Ausbildung größerer Aggregate. In den Titrationsexperimenten mit ZnCl_2 , NiCl_2 und FeCl_2 ist die Veränderung der Absorption bei etwa 1 – 1.5 Äquivalenten Metallsalz abgeschlossen. Auch die Form der Emissionsbanden ändert sich danach nicht mehr wesentlich. Es kommt in allen Fällen lediglich zu einer Verringerung der Emissionsintensität durch Zugabe weiterer Metallionen. Dies spricht wiederum für eine 2:1 Komplexstöchiometrie. Daraus kann man allerdings nicht direkt folgern, dass es sich um „side on“ verknüpfte Oligonukleotidaggregate handelt, da die Ausbildung eines metallionenvermittelten Basenpaares zur gleichen Komplexstöchiometrie führen würde.



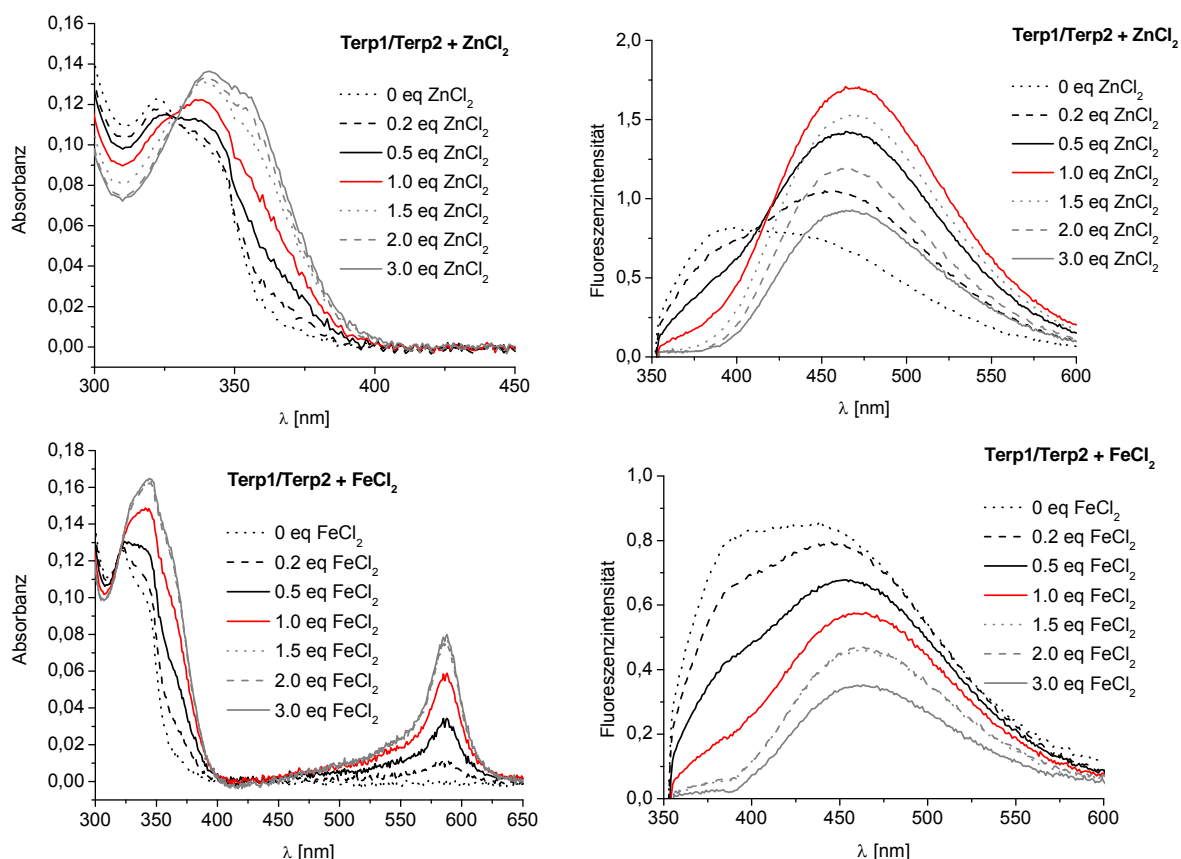


Abb. 93: Absorptions- und Emissionsspektren ($\lambda_{\text{ex}} = 345 \text{ nm}$) für die Titrations von **Terp1/Terp2** mit CuCl₂, NiCl₂, ZnCl₂ und FeCl₂

Trägt man die Fq-Werte im Emissionsmaximum der mit EDTA versetzten **Terp1/Terp2** Proben ($\lambda = 390 \text{ nm}$) gegen die zugegebenen Äquivalente an Metallionen auf, so zeigt sich, dass bei etwas weniger als 1.5 eq Metallionen die Fluoreszenz maximal gelöscht ist.

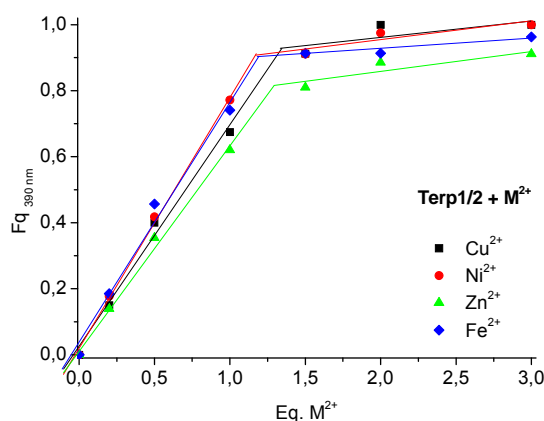


Abb. 94: Fluoreszenzlöschung von **Terp1/Terp2** bei $\lambda = 390 \text{ nm}$ für Zugabe unterschiedlicher Äquivalente an CuCl₂, NiCl₂, ZnCl₂ und FeCl₂ ($\lambda_{\text{ex}} = 345 \text{ nm}$).

Da sich in den **Terp1/Terp2**-Duplexen jeweils zwei terpyridinmodifizierte Uridine gegenüberstehen, muss natürlich auch die Möglichkeit einer Art metallvermittelter Basenpaarung berücksichtigt werden. Diese wurde ebenfalls zu einer 2:1 Komplexstöchiometrie, jedoch nicht zu einer Verknüpfung verschiedener Oligonukleotide führen. Um dies auszuschließen, wurden die Schmelztemperaturen der **Terp1/Terp2**-Duplexe bestimmt. Für den Fall einer metallionenvermittelten Basenpaarung sollten diese in Anwesenheit von Metallionen im Vergleich zur Referenz deutlich erhöht sein.^[23] Das Problem im Falle des Terpyridins ist allerdings, dass es sich bereits ohne Metallionen-Zugabe um ein sehr starkes hydrophobes Basenpaar handelt. In diesem Fall kann nicht einfach die metallfreie Probe als Referenz herangezogen werden, da es bei der Bildung einer metallionenvermittelten Basenpaarung zwangsläufig auch zu einem Aufbrechen des hydrophoben Basenpaares und somit zu einer Destabilisierung kommt. Man muss vielmehr den metallfreien Duplex **Terp1** ohne hydrophobes Basenpaar als Referenz heranziehen. Die Schmelztemperaturen der **Terp1/Terp2** Proben in Anwesenheit von einem Äquivalent des jeweiligen Zentralions sind in Tabelle 11 zusammengestellt.

Tabelle 11: Schmelztemperaturen der **Terp1/Terp2** Duplexe mit verschiedenen Metallionen. Die ΔT_m -Werte beziehen sich jeweils auf den Duplex **Terp1** als Referenz.

Oligonukleotid-Duplex	T_m [°C]	ΔT_m [°C]
Terp1/Terp2 EDTA	65.9	+ 9.1
Terp1/Terp2 + 1eq CuCl ₂	61.7	+ 4.9
Terp1/Terp2 + 1eq NiCl ₂	54.1 / 69.4	- 2.7 / + 12.8
Terp1/Terp2 + 1eq ZnCl ₂	64.4	+ 7.6
Terp1/Terp2 + 1eq FeCl ₂	53.3 / 70.0	- 3.5 / + 13.2

Die T_m -Werte der mit einem Äquivalent CuCl₂ und ZnCl₂ versetzten Proben liegen zwar unterhalb der T_m -Werte der EDTA-Proben, jedoch deutlich oberhalb der **Terp1**-Referenz. Es scheint demnach so zu sein, dass sich ein nicht besonders stabiles metallionenvermittelltes Basenpaar ausbildet, das den Duplex allerdings weniger stabilisiert als das starke hydrophobe Terpyridin-Basenpaar. Die mit FeCl₂ und NiCl₂ versetzten Proben weisen zwei Schmelztemperaturen auf. Der höhere der beiden T_m -Werte lässt sich, ähnlich wie bei den Cu²⁺ und Zn²⁺-Proben auf die Ausbildung einer metallionenvermittelten Basenpaarung zurückführen. Die im Vergleich dazu

erhöhten T_m -Werte lassen sich auf die höhere Stabilität der Fe^{2+} - und Ni^{2+} -Komplexe zurückführen. Der niedrigere T_m -Wert liegt im Bereich von $53^\circ C - 54^\circ C$ und kommt durch den Anteil der duplexverknüpfenden $M^{II}(tpy)_2$ -Komplexe zustande, da hier sowohl die Stabilisierung durch die hydrophobe, als auch durch die metallionenvermittelte Basenpaarung wegfällt. Diese Interpretation wird durch Gelelektrophorese-Experimente gestützt (vgl. Abb. 99 unten).

In Abb. 95 sind die verschiedenen Möglichkeiten der Basenpaarung und die entsprechenden Effekte für die T_m -Werte dargestellt.

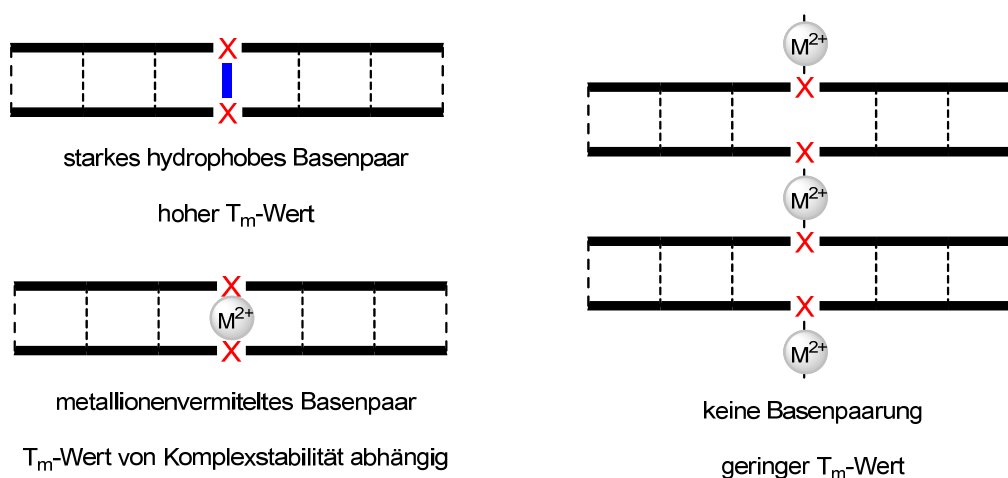


Abb. 95: Unterschiedliche Möglichkeiten der Basenpaarung in **Terp1/Terp2**-Duplexen

Für die Titrationsexperimente mit **Terp3/Terp4**, also dem an beiden Enden mit Terpyridin funktionalisierten Duplex, ergeben sich sehr ähnliche Beobachtungen wie für **Terp1/Terp2**. Bei der Titration mit $CuCl_2$ ist die Veränderung der Spektren auch hier erst bei ca. 2 eq. Cu^{2+} abgeschlossen. Für $NiCl_2$, $ZnCl_2$ und $FeCl_2$ ist in den Absorptionsspektren ab einer Zugabe von 1 eq. (Ni^{2+} , Zn^{2+}) bzw. 1.5 eq. (Fe^{2+}) Metallsalz keine Veränderung mehr erkennen (Abb. 96). Auch in den Emissionsspektren bleibt die Form der Banden danach unverändert und es kommt lediglich zu einer Verringerung der Emissionsintensität durch Zugabe weiterer Metallionen. Da hier keine metallionenvermittelten Basenpaarungen möglich sind, bedeutet die 2:1 Komplexstöchiometrie, dass es zur Ausbildung größerer Oligonukleotidaggregate kommt.

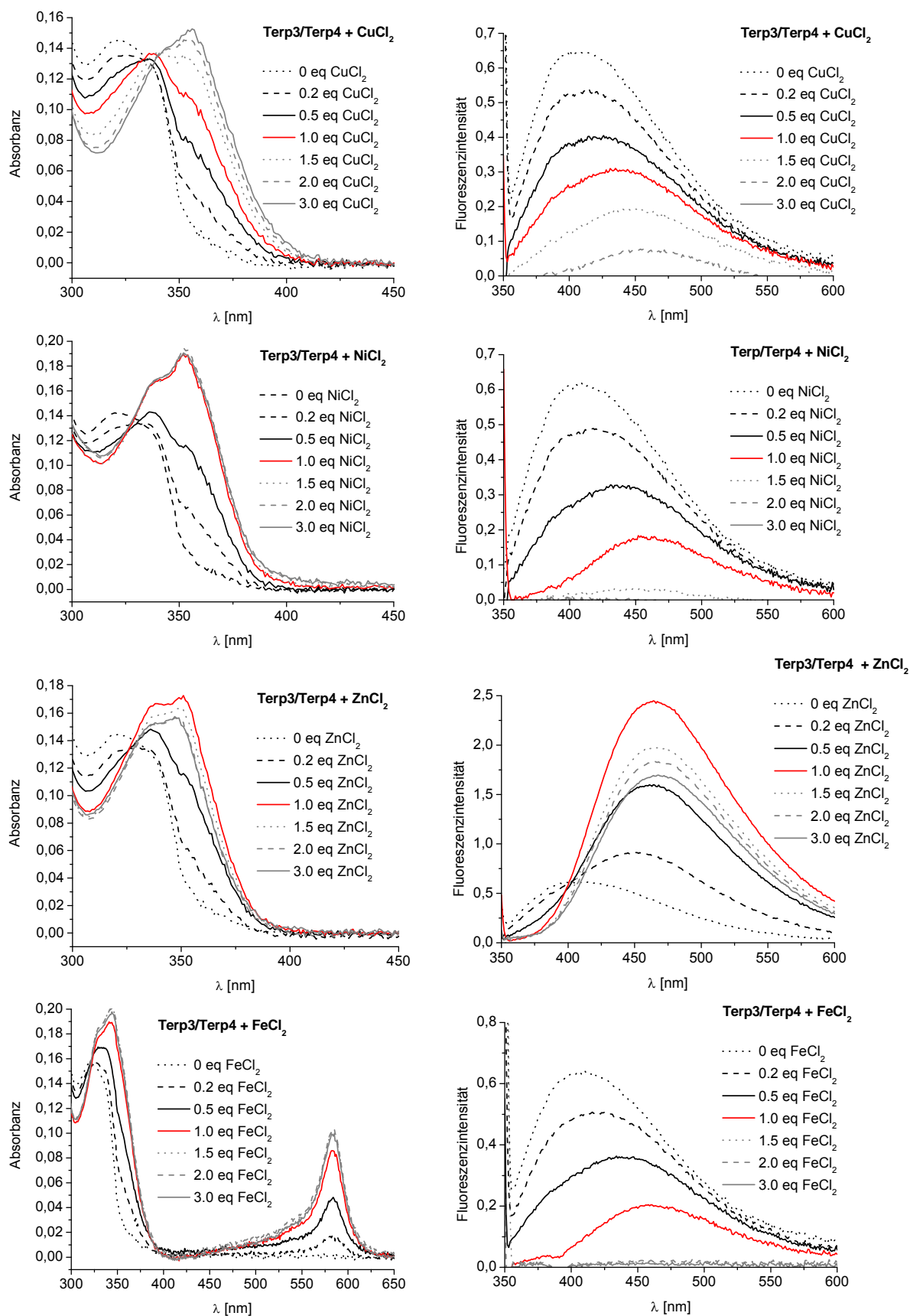


Abb. 96. Absorptions- und Emissionsspektren ($\lambda_{\text{ex}} = 345 \text{ nm}$) für die Titrations von **Terp3/Terp4** mit CuCl_2 , NiCl_2 , ZnCl_2 und FeCl_2

Trägt man die Fq-Werte im Emissionsmaximum der mit EDTA versetzten **Terp3/Terp4** Proben ($\lambda = 400$ nm) gegen die zugegebenen Äquivalente an Metallionen auf, so erkennt man, dass bei für Ni^{2+} , Zn^{2+} und Fe^{2+} bei ca. 1 eq. Metallionen die Fluoreszenz maximal gelöscht ist. Bei den Zn^{2+} Proben wurde aufgrund der intrinsischen Fluoreszenz des Komplexes der Fq-Wert bei $\lambda = 390$ nm verwendet. Für die Cu^{2+} -Titration wird eine quantitative Emissionslöschung erst bei ca. 2eq CuCl_2 erreicht.

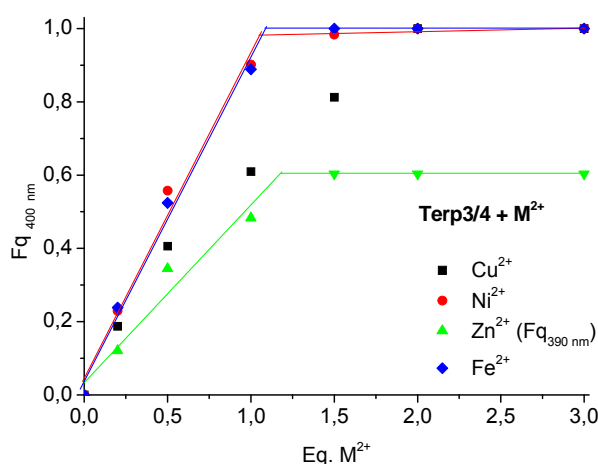


Abb. 97: Fluoreszenzlöschung von **Terp3/Terp4** bei $\lambda = 400$ nm für Zugabe unterschiedlicher Äquivalente an CuCl_2 , NiCl_2 , ZnCl_2 und FeCl_2 ($\lambda_{\text{ex}} = 345$ nm).

Ein weiterer Hinweis auf die Bildung größerer Aggregate ergibt sich für aus dem Verhalten der, mit einem Äquivalent ZnCl_2 versetzten **Terp3/Terp4**-Probe 24 h nach der Metallsalzzugabe. Es kommt zu einer Verringerung der DNA-Absorption im Bereich von 260 nm, was auf ein Ausfallen größerer DNA-Aggregate aus der Lösung hindeutet. Betrachtet man das Eppendorf-Cup in dem die Probe gelagert wurde im UV-Licht, so erkennt man einen fluoreszenten Niederschlag. Die Farbe der Emission des Niederschlags entspricht der des $\text{Zn}^{\text{II}}(\text{tpy})_2$ Komplexes.



Abb. 98: Fluoreszenter Niederschlag der **Terp3/Terp4** Probe mit 1 eq ZnCl_2 nach 24 h

Um die Bildung größerer Oligonukleotidaggregate zweifelsfrei nachzuweisen, wurden die **Terp1/Terp2** bzw. **Terp3/Terp4**-Proben mit 1.0 eq. Metallsalz versetzt und auf nicht-denaturierende 8%ige SB Whatman Gele aufgetragen. Als Referenz dienten bei den Gelelektrophorese-Experimenten mit EDTA ($c = 100 \mu\text{M}$) versetzte Proben ohne Metallsalz. Die Proben wurden vor dem Aufbringen auf die Gele mit Gel Star[®] - Fluoreszenzmarker versetzt um eine Fluoreszenzdetektion zu ermöglichen.

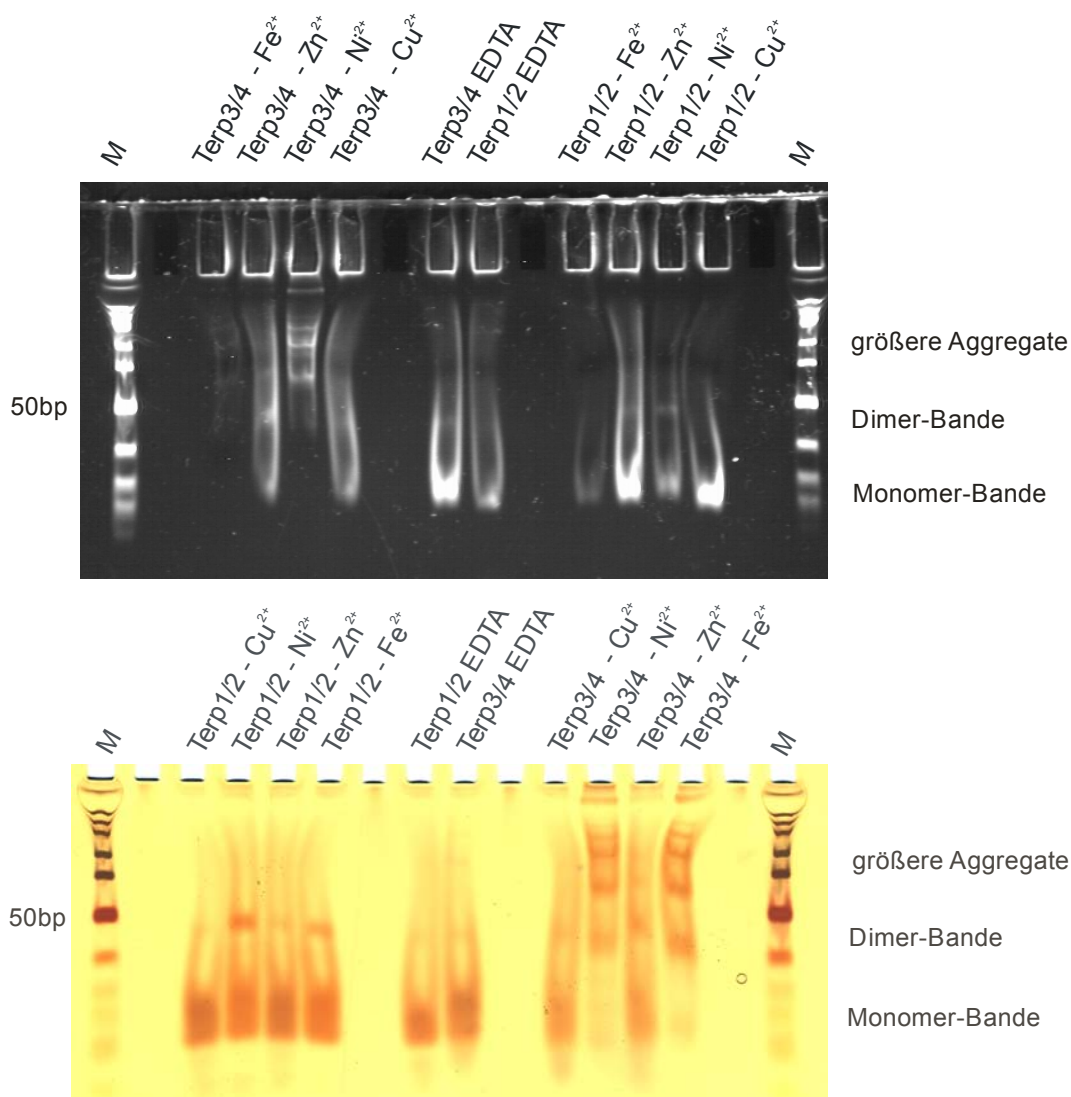


Abb. 99: Gelbilder der **Terp1/Terp2** bzw. **Terp3/Terp4**-Proben mit je 1.0 eq M²⁺

Auf den Gelen erkennt man für die **Terp1/Terp2** Proben anhand der Fluoreszenz keine Aggregationsprodukte (Abb. 99 oben). In der deutlich sensitiveren Silberfärbung lassen sich schwache Dimer-Banden bei Fe²⁺ und Ni²⁺ erkennen (Abb. 99 unten). Diese Beobachtung deckt sich mit den T_m-Experimenten und deutet auf

die bevorzugte Ausbildung des metallionenvermittelten Basenpaares hin. Nur für Fe^{2+} und Ni^{2+} wird ein geringer Anteil von Oligonukleotidduplexen „side on“ verknüpft. Bei den **Terp3/Terp4**-Proben sind auf den Gelen im Falle der mit Cu^{2+} und Zn^{2+} versetzten Proben kaum andere Banden als die des **Terp3/Terp4**-Monomers zu erkennen. Dies deckt sich mit den Ergebnissen für die ebenfalls terminal modifizierten **Terp3**-Proben und ist daher nicht weiter verwunderlich. Die mit Ni^{2+} und Fe^{2+} versetzten Proben zeigen keine Monomerbande mehr. Stattdessen sind sowohl die Dimer-Bande als auch Banden für größere Aggregate deutlich zu erkennen.

5.3.4 Zusammenfassung der Ergebnisse

Im Rahmen dieser Arbeit wurde das in 5-Position mit Terpyridin funktionalisierte Uridinderivat (**39**) in neun Stufen synthetisiert und erstmals mittels automatisierter Festphasensynthese in Oligonukleotide eingeführt. Es konnte gezeigt werden, dass der freie Terpyridin-Ligand je nach Position in den Oligonukleotiden und der Basenumgebung ein unterschiedliches Emissionsverhalten zeigt. Dies konnte auf die Ausbildung eines starken hydrophoben Basenpaares und Ladungstransferprozesse zwischen Terpyridin und den DNA-Basen zurückgeführt werden.

Durch Titrationsexperimente und Gelelektrophorese konnte zweifelsfrei nachgewiesen werden, dass es möglich ist, Oligonukleotide ohne Verwendung eines zusätzlichen Linkers „end on“ und „side on“ zu Dimeren zu verknüpfen. Die Bildung größerer Aggregate wurde für die „end on“ Koordination (**Terp3/Terp4**) zweifelsfrei nachgewiesen. Die Bindungsstärke und Reversibilität der Komplexbildung lässt sich einfach durch die Wahl des Zentralions steuern.

Diese Arbeit stellt somit das erste Beispiel für einen Aufbau größerer DNA-Strukturen über einen derartig rigide angeknüpften Liganden dar und lässt in Gegensatz zu allen bisherigen metallvermittelten Oligonukleotidverknüpfungen die Möglichkeit einer elektronischen Kopplung zwischen den Oligonukleotiden und dem Metallkomplex zu. Dadurch wäre es theoretisch möglich, Ladungen von einem DNA-Duplex über den Terpyridin-Komplex in einen anderen DNA-Duplex zu transferieren und somit einen großen Schritt in Richtung komplexer Nanoleiter zu machen. Die Beantwortung der Frage, ob dies allerdings tatsächlich funktioniert und welche Bedingungen bzw. Metallionen dafür nötig sind, bedarf jedoch noch vieler weiterer Experimente.

6 DIMAPdU als nukleosidischer Elektronendonator

6.1 Pyrenmodifizierte Nukleoside als fluoreszente Sonden für Ladungstransferreaktionen

In den vergangenen Jahren wurde von verschiedenen Arbeitsgruppen eine Reihe pyrenmodifizierter Nukleoside publiziert. Als repräsentative Beispiele sind in Abb. 100 die Basensurrogate von *Kool et al.*,^[281, 307-309] *Woski et al.*,^[310] *Berlin et al.*^[311] und *Pedersen et al.*,^[312] sowie die pyrenmodifizierten Uridinderivate von *Netzel et al.*^[313, 314] gezeigt.

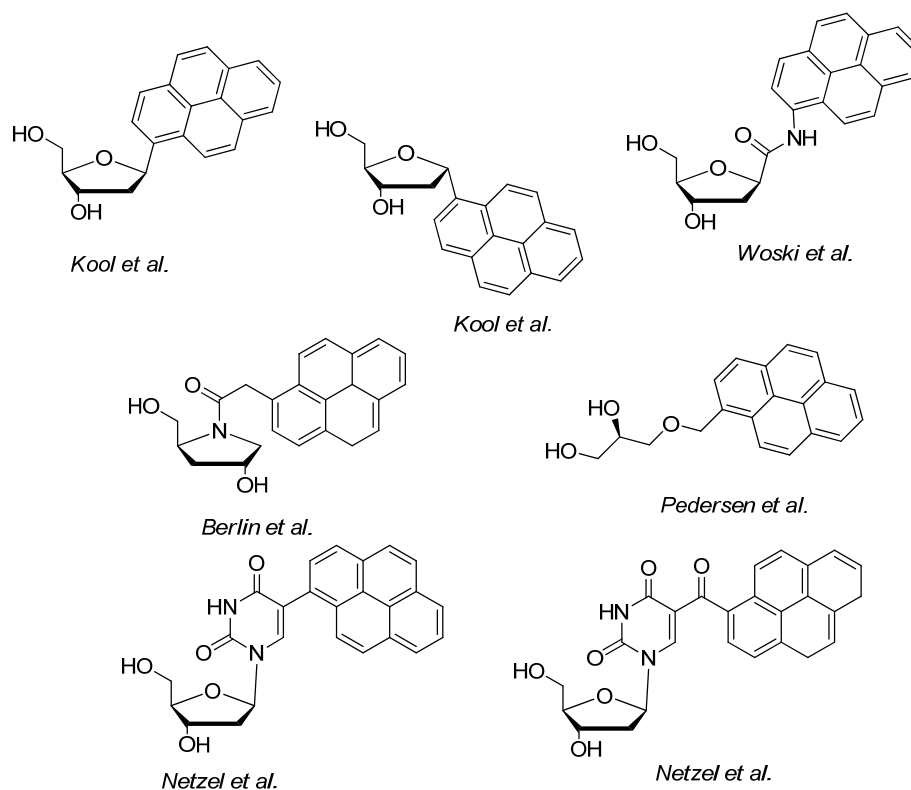


Abb. 100: Überblick über einige der bisher synthetisierten pyrenmodifizierten Nukleoside und Basensurrogate

In der Arbeitsgruppe *Wagenknecht* wurden die vier natürlichen Nukleoside A, G, C und dU an 5- bzw. 8-Position der Base mit dem Pyrenchromophor modifiziert und optisch charakterisiert (Abb. 101).^[315, 316] Die Synthese dieser Nukleoside verläuft über eine Suzuki-Miyaura-Kreuzkupplung zwischen den halogenierten DNA-Basen

und der 1-Pyrenylboronsäure. Die Darstellung der benötigten 1-Pyrenylboronsäure wurde bereits in der Literatur beschrieben.^[317, 318] Die iodierten Derivate der Nukleoside C und dU sind kommerziell erhältlich, G und A müssen hingegen vor der Kreuzkupplung halogeniert werden. Bromierungsreaktionen der Purinbasen sind ebenfalls literaturbekannt.^[319-321]

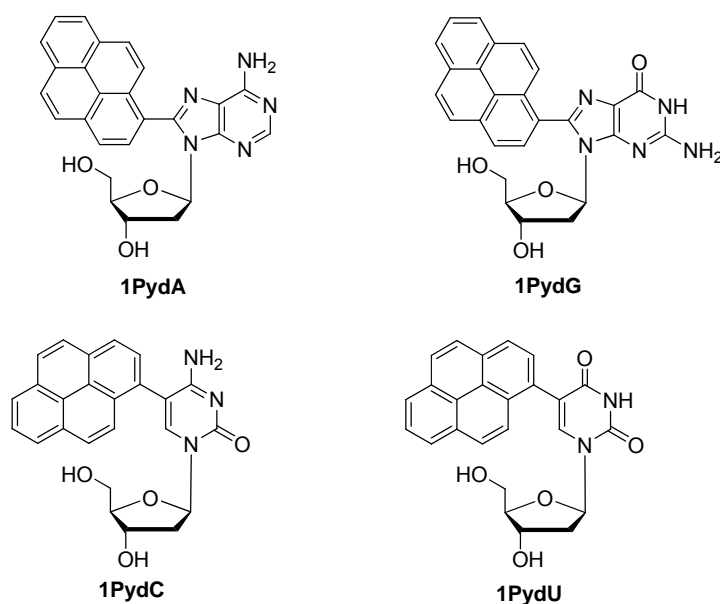


Abb. 101: Pyrenmodifizierte DNA-Basen

Netzel et al. untersuchten den Einfluss der benachbarten DNA-Basen auf die Fluoreszenzlebenszeiten des angeregten Pyren-Chromophors.^[322] Sie fanden heraus, dass photoangeregtes Pyren (Py^*) in C- und T-Umgebung als Elektronendonator und in G-Umgebung als Elektronenakzeptor fungiert. Demzufolge kann Py^* je nach Basenumgebung reduktiven bzw. oxidativen Ladungstransfer induzieren.

Die Arbeitsgruppe *Wagenknecht* untersuchte das Redoxverhalten von 1PydU und 2PydU (vgl. Abb. 102) im Vergleich zum unmodifizierten Pyren.^[323] Dabei wurden sowohl die Potentiale im Grundzustand der entsprechenden Verbindungen bestimmt als auch deren Potentiale im angeregten Zustand über die Rehm-Weller-Gleichung abgeschätzt. Aus Tabelle 12 kann man entnehmen, dass photoangeregtes Pyren (Py^*) ein guter Elektronendonator ist, der intermolekularen und intramolekularen Ladungstransfer induzieren kann. Die Triebkraft für eine Reduktion der DNA-Basen ist allerdings unter Verwendung des von *Fiebig et al.* ermittelten Potentials von

$E_{\text{red}}(\text{T}/\text{T}^{\bullet-}) = -1.8 \text{ V}$ näherungsweise gleich null.^[324] Allerdings findet man in der Literatur sehr stark abweichende Werte für die Redoxpotentiale der DNA-Basen. Legt man das von *Steenken et al.* ermittelte Reduktionspotential von $E_{\text{red}} = -1.1 \text{ V}$ für T bzw. dU zugrunde,^[325] so erhält man eine Triebkraft von $\Delta G = -0.63 \text{ eV}$. Der starke Unterschied in den Literaturwerten resultiert aus der Irreversibilität im Oxidations- und Reduktionsverhalten der natürlichen Nukleoside und der Beeinflussung der Potentiale durch Stapelungswechselwirkungen der Nukleobasen untereinander.^[90, 326] Die Potentiale von 1PydU und 2PydU sind denen des Pyrens recht ähnlich und unterscheiden sich auch untereinander nicht wesentlich (vgl. Tabelle 12).

Tabelle 12: Übersicht über die Redoxpotentiale von 1PydU, 2PydU und Pyren im Vergleich zu den Redoxpotentialen von G und T; Potentiale sind gegen NHE angegeben.^[323]

	$E_{00}(\text{Py}) [\text{eV}]$	$E_{\text{red}}(\text{Py}/\text{Py}^{\bullet-}) [\text{V}]$	$E_{\text{red}}^*(\text{Py}^*/\text{Py}^{\bullet-}) [\text{V}]$	$E_{\text{ox}}(\text{G}/\text{G}^{\bullet+}) [\text{V}]$ ^[91]
1PydU	+ 3.30	- 2.02	+ 1.28	ca. + 1.30
2PydU	+ 3.33	- 2.08	+ 1.25	
Pyren	+ 3.25 ^[327]	- 1.90 ^[327]	+ 1.35	
	$E_{00}(\text{Py}) [\text{eV}]$	$E_{\text{ox}}(\text{Py}/\text{Py}^{\bullet+}) [\text{V}]$	$E_{\text{ox}}^*(\text{Py}^*/\text{Py}^{\bullet+}) [\text{V}]$	$E_{\text{red}}(\text{T}/\text{T}^{\bullet-}) [\text{V}]$ ^[324, 328]
1PydU	+ 3.30	+ 1.55	- 1.75	ca. – 1.80
2PydU	+ 3.33	+ 1.53	- 1.80	
Pyren	+ 3.25 ^[327]	+ 1.52 ^[327]	- 1.73	

Trotzdem spielt die Verknüfungsposition am Pyren eine entscheidende Rolle für die Elektronentransfereigenschaften der Moleküle. Um dies zu verstehen, ist es notwendig sich die am Elektronentransfer beteiligten Orbitale des Pyrens anzusehen. Wie in Abschnitt 3.3 erwähnt, handelt es sich beim reduktiven Elektronentransfer um einen LUMO-kontrollierten Prozess. Vergleicht man die berechneten LUMOs von 1PydU und 2PydU miteinander fallen die unterschiedlichen Elektronendichten in 1- und 2- Position des Pyrens auf. Während die Elektronendichte in 1-Position hoch ist und es im 1PydU zu einer starken elektronischen Kopplung und einer Delokalisierung der Elektronen zwischen Pyren und Uridin kommt, ist die Elektronendichte in 2-Position sehr gering, was zu einem deutlich stärker lokalisierten aromatischen System im 2PydU führt. Die Elektronendichten wurden

nach der semiempirischen AM1-Methode nach vollständiger geometrischer Optimierung berechnet und sind in Abb. 102 dargestellt.

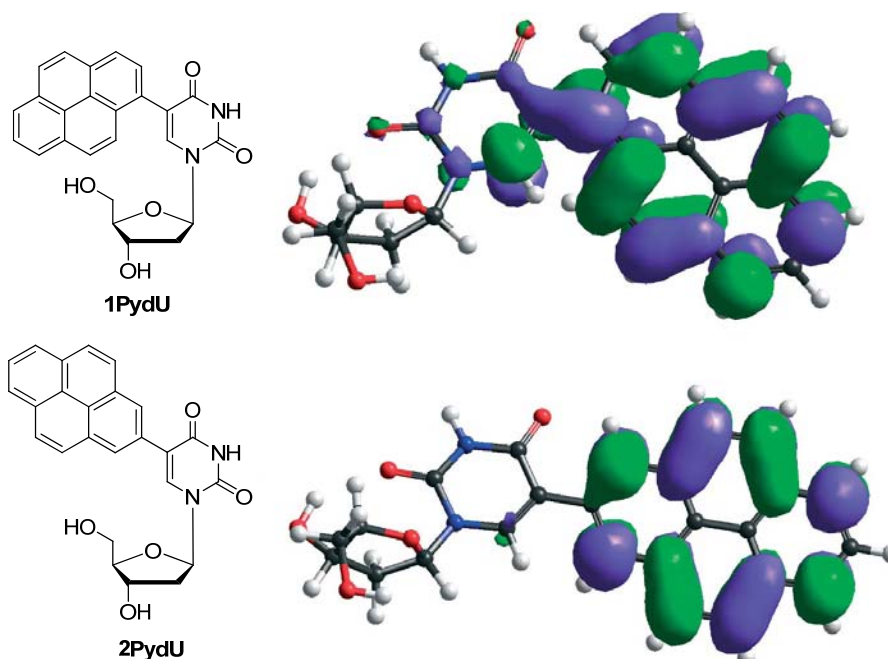


Abb. 102: LUMOs von 1PydU und 2PydU (berechnet nach der semiempirischen AM1 Methode nach geometrischer Optimierung).^[180]

Durch die starke elektronische Kopplung im 1PydU kann es aufgrund der Redoxpotentiale im angeregten Zustand zu einem intramolekularen Elektronentransfer von Pyren auf Uridin kommen. Solche intramolekularen Ladungstransferzustände weisen eine strukturlose, lösungsmittelabhängige Fluoreszenz auf und können als Exciplexe betrachtet werden.^[314] Derartige Exciplexe enthalten sowohl Beiträge des lokal angeregten Zustands Py^*dU als auch des ladungstrennten Zustands Py^+dU^- . Im 2PydU sind die Beiträge des ladungstrennten Zustands sehr gering und die Emission zeigt die typische Feinstruktur des lokal angeregten Pyrens.^[180]

Ein Problem für Untersuchungen von Elektronentransferprozessen mit 1PydU und 2PydU stellen die Potentiale im angeregten Zustand dar. Sowohl für einen reduktiven Elektronentransfer aus dem photoangeregten Zustand auf T oder C, als auch für einen photoinduzierten oxidativen Lochtransfer auf G liegen die Potentiale im Grenzbereich (Tabelle 12). Dadurch ist es schwierig zu sagen, durch welchen der beiden Prozesse die Pyrenfluoreszenz gelöscht wird. Um dieses Problem zu umgehen, aber dennoch die bevorzugte elektronische Entkopplung wie beim 2PydU

zu erhalten, sollte ein elektronenreiches 2PydU-Derivat synthetisiert und als Elektronendonator für Ladungstransferprozesse in DNA eingesetzt werden. Die Redoxpotentiale des angeregten Zustands sollten also in einer Weise verschoben werden, dass die T-Reduktion mit größerer Triebkraft abläuft und keine G-Oxidation mehr möglich ist. Aufgrund der zu erwartenden Eigenschaften und der synthetischen Zugänglichkeit sollte das elektronenreiche 2PydU-Derivat 5-(6-*N,N*-Dimethylamino-2-pyrenyl)-2'-deoxyuridin (DIMAPdU) synthetisiert und als photoanregbarer Elektronendonator charakterisiert werden.

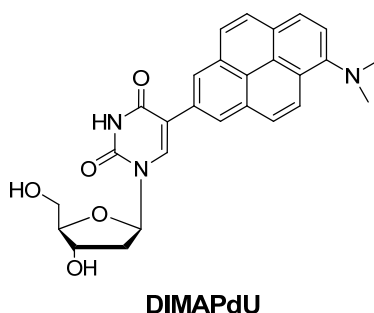


Abb. 103: Struktur von DIMAPdU

6.2 Synthese von 5-(6-*N,N*-Dimethylamino-2-pyrenyl)-2'-deoxyuridin (DIMAPdU)

Pyrenmodifizierte Nukleoside wie 2PydU lassen sich über palladiumkatalysierte Suzuki-Miyaura-Kreuzkupplung aus der Pyrenylboronsäure bzw. aus dem Pyrenylboronsäureester und den entsprechenden halogenierten Nukleosiden darstellen.^[329] Die Suzuki-Kupplung eignet sich hervorragend für Nukleosid-Synthesen, da sie sogar in wässrigen Lösungen durchführbar ist und ungeschützte Hydroxy- und Aminfunktionen toleriert.^[330] In der Arbeitsgruppe *Wagenknecht* wurde bereits eine Reihe von Fluorophoren auf diese Weise an Nukleoside geknüpft.^[140, 216] Um diese Methode anwenden zu können, muss das entsprechende Boronsäure- bzw. Boronsäureester-Derivat des Fluorophors synthetisch zugänglich sein. Im Falle des Pyrens lässt sich zur Darstellung des 2-Pyren-Boronsäureesters allerdings die Standardvariante der Halogenierung und anschließender Funktionalisierung mit dem Boronsäureester nicht anwenden. Elektrophile Substitutionen an Pyren führen nämlich grundsätzlich zu einer Funktionalisierung in 1-Position und anschließend zu

1,3-, 1,6- und 1,8-disubstituierten Produkten.^[331] Eine verbreitete Möglichkeit zur Einführung funktioneller Gruppen in die 2-Position besteht in der Reduktion von Pyren zu 4,5,9,10-Tetrahydropyren mittels katalytischer Hydrierung.^[332] Diese Verbindung kann in der 2-Position halogeniert und anschließend reoxidiert werden.^[333, 334] Eine neuere Variante beruht auf Publikationen von *Hartwig* und *Miyaura*, in denen gezeigt wird, dass Iridium-Verbindungen die direkte Borylierung von Aromaten katalysieren.^[335, 336] *Coventry et al.* publizierten 2005 eine selektive direkte Borylierung von Pyren in der 2-Position.^[337] Dieses Verfahren wurde im Arbeitskreis *Wagenknecht* bereits erfolgreich bei der Synthese von 2PydU angewandt.^[180] Im Rahmen dieser Arbeit sollte die gleiche Strategie bei der selektiven Borylierung von 1-(*N,N*-Dimethylamino)-pyren Anwendung finden.

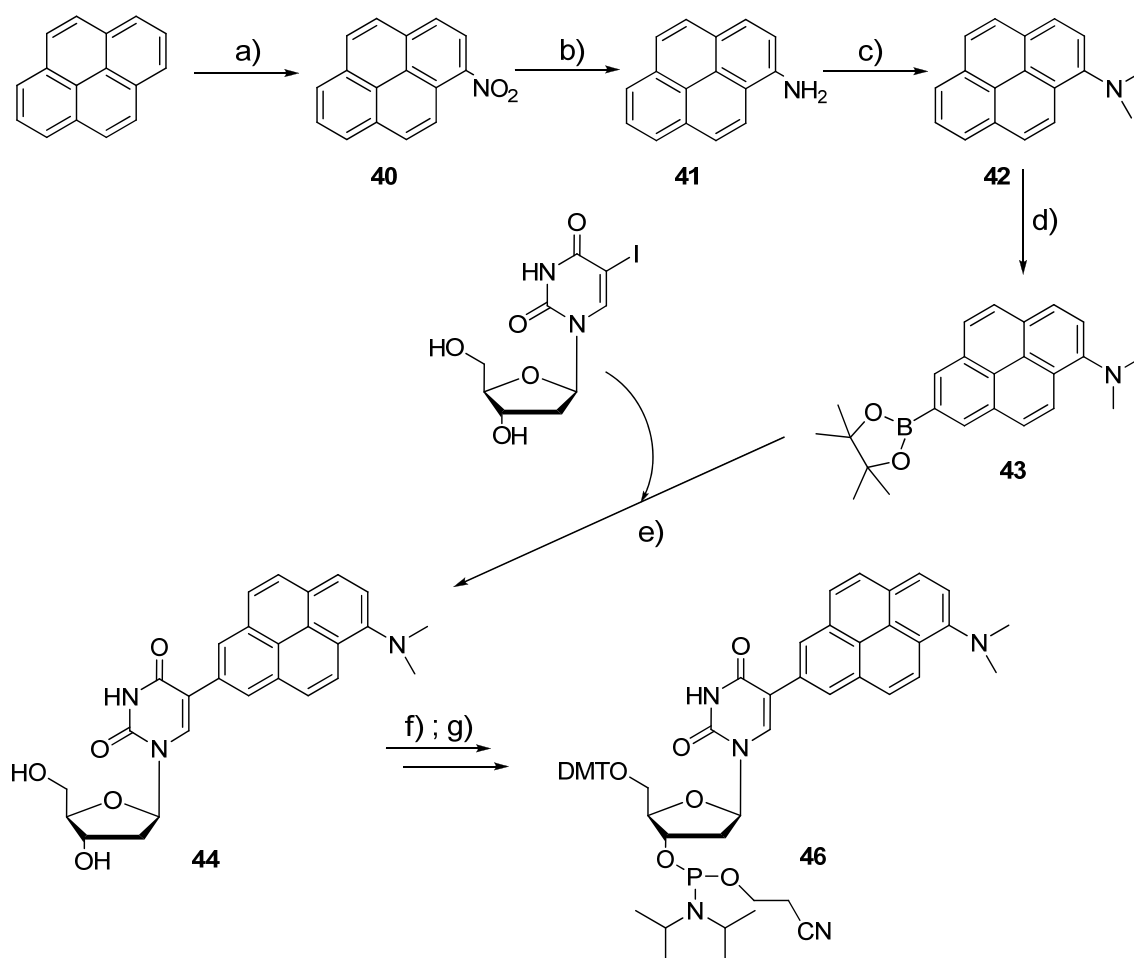


Abb. 104: Synthese von DIMAPdU: **a)** 65% ige HNO_3 in AcOH , 3 h, RT, 95%; **b)** NaSH in $\text{EtOH}/\text{H}_2\text{O}$, 90 min, Rückfluss, 80%; **c)** 1) NaBH_4 in abs. THF, 2) $\text{CHO} / 3\text{M } \text{H}_2\text{SO}_4$ in abs. THF, 3) H_2SO_4 , 4) KOH ; **d)** Bispinacolboran, dtbpy, $[\text{Ir}(\text{OMe})(\text{COD})]_2$ in abs. Cyclohexan, 20 h, 80°C , 67%; **e)** Na_2CO_3 , $\text{Pd}(\text{dppf})_2\text{Cl}_2$ in $\text{MeCN}/\text{H}_2\text{O}$, 16 h, 70°C , 68%; **f)** DMTCl in abs. Pyridin, ü. N., 30°C , 77%; **g)** 2-Cyanoethoxy-*N,N*-diisopropylaminochlorophosphoramidit, DIPEA in abs. CH_2Cl_2 , 4 h, RT, 95%;

Die Synthese von 1-Aminopyren (**41**) erfolgte in zwei Schritten nach Literaturvorschriften.^[338] Dabei wird Pyren zuerst mit HNO_3 nitriert (**40**) und dann mit NaSH reduziert (**41**). Anschließend wird die Aminfunktion methyliert (**42**, DIMAP).^[339] Die regioselektive Borylierung zu **43** wird unter Verwendung von $[\text{Ir}(\text{OMe})(\text{COD})]_2$ und Bispinacolboran erreicht. Die Regiochemie im Produkt lässt sich sowohl im einfachen ^1H -NMR, als auch im 2D COSY-Experiment nachweisen. Eine Suzuki-Kupplung mit 5-Iodo-2'-deoxyuridin unter Verwendung von $\text{Pd}(\text{dppf})_2\text{Cl}_2$ als Katalysator führt zum mit Dimethylaminopyren modifizierten Uridin **44** (DIMAPdU). Die weiteren Schritte der DMT-Schätzung bzw. Umsetzung zum Phosphoramidit-Baustein (**46**) wurden unter Verwendung von DMT-Cl bzw. 2-Cyanoethoxy-*N,N*-diisopropylaminochlorophosphoramidit erreicht.

6.3 Spektroskopische und elektrochemische Charakterisierung von DIMAP und DIMAPdU

CV-Messungen und Potentiale im angeregten Zustand

Um zu untersuchen, ob die Einführung der Dimethylamino-Gruppe am Pyren tatsächlich den erwarteten Einfluss auf die Redox Eigenschaften hat wurden zunächst Cyclovoltammogramme sowohl von DIMAP als auch von DIMAPdU aufgenommen. Die Potentiale wurden mit Ferrocen als internem Standard gemessen und anschließend mit einer Umrechnungskonstante von +0.63 V in Potentiale gegen NHE umgerechnet.^[340] Exemplarisch wird in Abb. 105 die CV-Messung von DIMAP gezeigt.

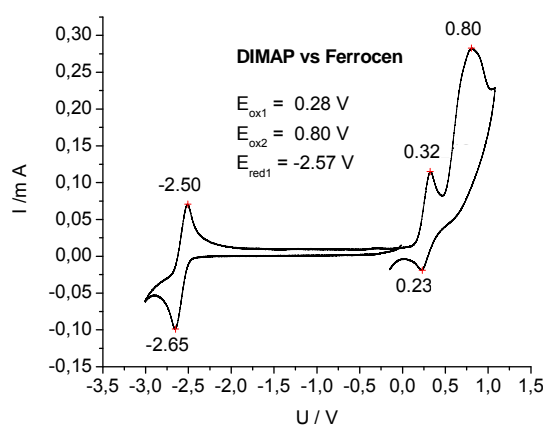


Abb. 105: CV von DIMAP korrigiert gegen Ferrocen (Fc/Fc^{++}); Leitsalz: 50mM TBAHFP, $\nu = 200 \text{ mV/s}$.

Aus den gemessenen Redoxpotentialen und den E_{00} -Werten für DIMAP und DIMAPdU lassen sich nach der Rehm-Weller-Gleichung die Potentiale im angeregten Zustand abschätzen. Anhand der elektrochemischen Daten (Tabelle 13) lässt sich dann eine Aussage über das Oxidations- und Reduktionsverhalten der angeregten Verbindungen gegenüber den DNA-Basen machen. Man erkennt, dass E_{red}^* (DIMAPdU) mit 0.99 V deutlich unter dem Oxidationspotential von Guanin liegt. Die Triebkraft ΔG beträgt ca. +0.3 eV, demnach ist eine Guaninoxidation durch photoangeregtes DIMAPdU sehr wahrscheinlich nicht möglich. Im Gegensatz dazu liegt E_{ox}^* (DIMAPdU) mit -2.19 V deutlich unterhalb des Reduktionspotentials von -1.80 V für Thymin. Daraus ergibt sich für den Elektronentransfer eine Triebkraft ΔG von ca. -0.4 eV. Selbstverständlich gilt dies für inter- und intramolekularen Ladungstransfer gleichermaßen.

Tabelle 13: Übersicht über die Redoxpotentiale von 2PydU, DIMAP und DIMAPdU im Vergleich zu den Redoxpotentialen von G und T; Potentiale sind gegen NHE angegeben

	E_{00} [eV]	E_{red} [V]	E_{red}^* [V]	$E_{\text{ox}}(\text{G/G}^*)$ [V] ^[91]
2PydU	+ 3.33	- 2.08	+ 1.25	
DIMAP	+ 3.07	- 1.94	+ 1.13	ca. + 1.30
DIMAPdU	+ 3.07	- 2.08	+ 0.99	
	E_{00} [eV]	E_{ox1} [V]	E_{ox1}^* [V]	$E_{\text{red}}(\text{T/T}^*)$ [V] ^[324, 328]
2PydU	+ 3.33	+ 1.53	- 1.80	
DIMAP	+ 3.07	+ 0.91	- 2.16	ca. - 1.80
DIMAPdU	+ 3.07	+ 0.88	- 2.19	

UV/Vis- und Emissionsspektren

Um die optischen Eigenschaften von DIMAPdU zu charakterisieren und mit denen von 1-(*N,N*-Dimethylamino)-pyren (DIMAP) zu vergleichen, wurden Absorptions- und Emissionsspektren in EtOH und MeCN aufgenommen. Es ist bekannt, dass sich die Dynamik des intramolekularen Elektronentransfers in protischen und nicht-protischen Lösungsmitteln deutlich unterscheidet.^[316, 341] Im UV/Vis Spektrum erkennt man, dass sowohl DIMAP als auch DIMAPdU eine weitgehend lösungsmittelunabhängige Absorption zeigen. Es fällt auf, dass in beiden Fällen die für Pyren typische Feinstrukturierung der Absorptionsbanden nicht auftritt (vgl. Abb. 106). Zudem sind

sowohl das UV/Vis Spektrum von DIMAP als auch von DIMAPdU gegenüber dem von Pyren bathochrom verschoben. Im Bereich zwischen $\lambda = 325$ nm und $\lambda = 400$ nm erscheint die Bande des S_0 - S_2 Übergangs. Ob darin auch ein Anteil des im Pyren stark verbotenen S_0 - S_1 Übergangs enthalten ist, lässt sich aufgrund der verbreiterten Bande nur schwer sagen. Die Banden bei geringeren Wellenlängen entsprechen den jeweiligen S_0 - S_3 und S_0 - S_4 Übergängen.

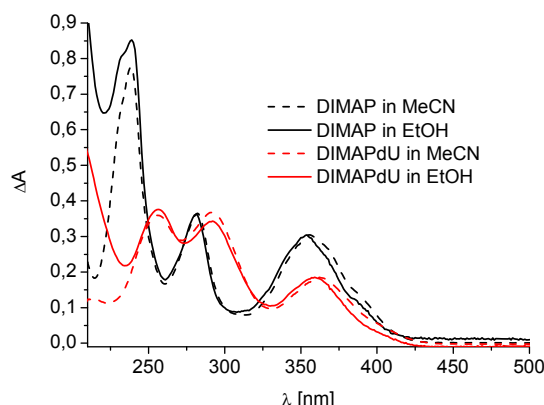


Abb. 106: Absorptionsspektren von DIMAP (schwarz) und DIMAPdU (rot) in MeCN (gestrichelt) und EtOH. ($c = 10 \mu\text{M}$)

In den Emissionsspektren erkennt man eine leichte hypsochrome Verschiebung der DIMAP-Emission beim Übergang von MeCN zu EtOH. Es fällt auf, dass die Emission von DIMAPdU gegenüber der von DIMAP beinahe quantitativ gelöscht wird (Abb. 107 links).

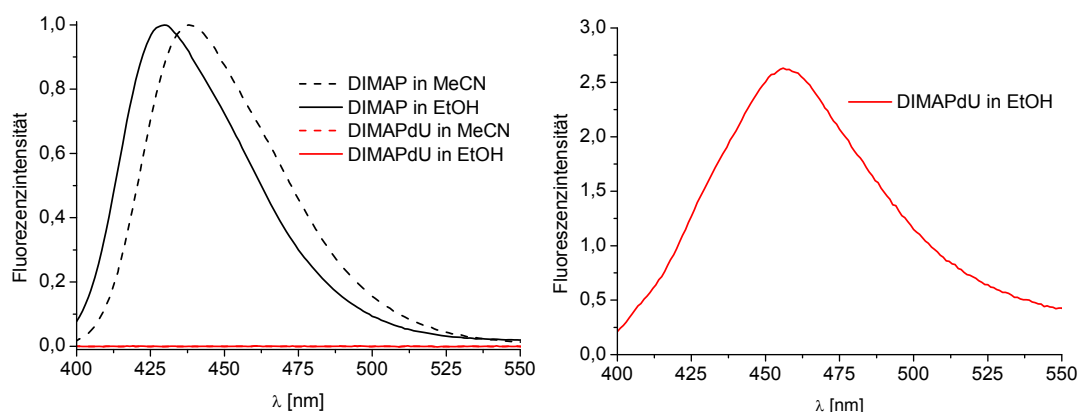


Abb. 107: links: Fluoreszenzspektren von DIMAP (schwarz) und DIMAPdU (rot) in MeCN (gestrichelt) und EtOH; die Maximalwerte der DIMAP-Emission wurden auf 1 normiert. ($c = 10 \mu\text{M}$, $\lambda_{\text{ex}} = 357$ nm, slits: 2nm) rechts: Emissionsspektrum von DIMAPdU in EtOH bei deutlich größeren Spaltbreiten für Anregungs- und Emissionslicht ($c = 10 \mu\text{M}$, $\lambda_{\text{ex}} = 357$ nm, slits: 7nm)

Die Fluoreszenzlöschung beruht auf der Ausbildung eines nicht emittierenden intramolekularen ladungstrennten Zustands aus dem emittierenden lokal angeregten Zustand ($\text{DIMAP}^*\text{dU} \rightarrow \text{DIMAP}^{*+}\text{-dU}^{-}$). Warum es zur Ausbildung eines solchen Zustandes kommt und wie dies nachgewiesen werden kann, wird in den folgenden Abschnitten erläutert.

Die spektroskopischen Daten von DIMAP und DIMAPdU sind in Tabelle 14 zusammengestellt.

Tabelle 14: Spektroskopischen Daten für DIMAP und DIMAPdU

Verbindung (LM)	λ_{max} (abs) [nm]	λ_{max} (em) [nm]
DIMAP (MeCN)	238, 281, 355	438
DIMAP (EtOH)	239, 281, 354	430
DIMAPdU (MeCN)	254, 292, 359	451
DIMAPdU (EtOH)	256, 291, 361	456

Spektroelektrochemische Untersuchungen

Um die bei der Reduktion bzw. Oxidation von DIMAP und DIMAPdU entstehenden Radikale spektroskopisch zu charakterisieren, wurden spektroelektrochemische UV/Vis-Absorptionsmessungen durchgeführt. Das bedeutet, es wurden Absorptionsspektren bei unterschiedlichen angelegten Potentialen gemessen. In früheren Arbeiten der Arbeitsgruppe *Wagenknecht* wurde dies bereits für die pyrenmodifizierten Nukleoside 1PydU und 2PydU durchgeführt.^[323] Dabei wurde festgestellt, dass nur die Radikalanionen detektiert werden konnten. Für die Charakterisierung als Elektronendonator ist aber gerade das Radikalkation von großem Interesse. Sowohl für DIMAP als auch für DIMAPdU konnten die Radikalanionen und die Radikalkationen spektroskopisch charakterisiert werden.

Für die Reduktion von DIMAP (Abb. 108 links) lässt sich in Einklang mit den CV-Messungen bis zu einer Spannung von -2000 mV keine Veränderung der Absorption erkennen. Bei höheren negativen Spannungen kommt es zu einem Absinken der DIMAP-Absorption im Bereich von $\lambda = 280$ nm und $\lambda = 358$ nm. Das entstehende $\text{DIMAP}^{\bullet-}$ -Radikalanion zeigt drei feinaufgespaltene Absorptionsbanden bei $\lambda_{\text{max}} = 330$ nm, 393 nm und 504 nm, die in ihrer Struktur stark an die typischen

Absorptionsbanden des Pyrens erinnern. Zusätzlich bildet sich noch eine schwache Bande bei $\lambda = 735$ nm aus.

Die Oxidation von DIMAP (Abb. 108 rechts) wird bereits bei wesentlich geringeren Spannungen erreicht. Schon ab einem Potential von +700 mV ist die Bildung des DIMAP^{•+}-Radikalkations zu erkennen. Bei höheren Spannungen nimmt die DIMAP-Absorption bei $\lambda = 280$ nm und $\lambda = 358$ nm ab und es kommt zur Ausbildung der Radikalkationbanden bei $\lambda = 303$ nm und $\lambda = 474$ nm. Im Vergleich zu den Radikalanionbanden ist für DIMAP^{•+} keine Feinaufspaltung der Absorption zu erkennen.

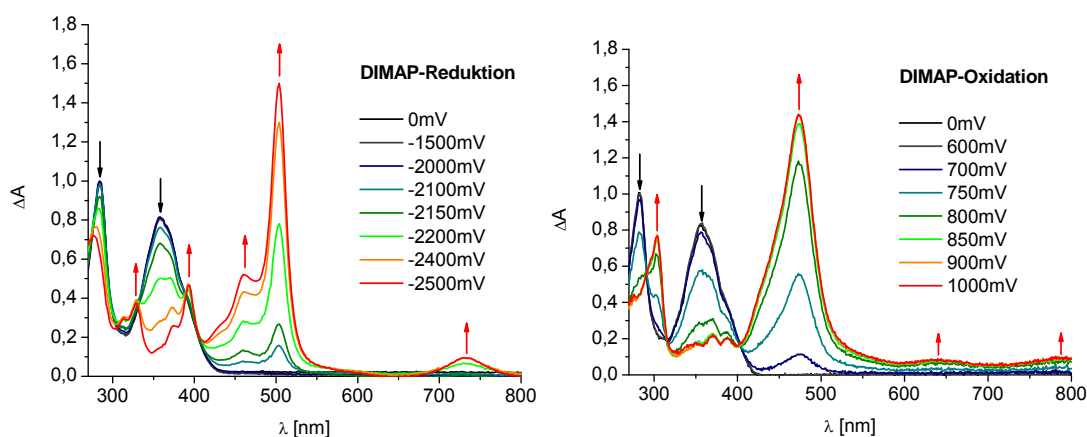


Abb. 108: Spektroelektrochemische Absorptionsmessungen für DIMAP; links: Reduktion, rechts: Oxidation; LM: DMF, Leitsalz: 150 mM TBAHFP;

Bei der spektroelektrochemischen Betrachtung der Reduktion von DIMAPdU muss berücksichtigt werden, dass auch Uridin bei stark negativen Potentialen reduziert werden kann. Aus transienten Absorptionsmessungen in der Literatur ist bekannt, dass das U^{•-}-Radikal in einem Wellenlängenbereich um $\lambda = 320$ nm und das vergleichbare T^{•-}-Radikal um $\lambda = 340$ nm absorbieren.^[342-345] Da dies allerdings auch der Wellenlängenbereich der DIMAP-Absorption ist, ist aufgrund der Überlagerung der Banden nicht festzustellen, ob eine dU-Reduktion auftritt. Unterhalb einer Spannung von -2000 mV lässt sich lediglich eine leichte Rotverschiebung der Absorptionsbande im Bereich von $\lambda = 300$ nm beobachten, was sich wiederum mit den Ergebnissen aus den CV-Messungen deckt. Bei stärker negativen Potentialen lässt sich ein Absinken der DIMAP-Absorption bei $\lambda = 310$ nm und $\lambda = 365$ nm beobachten. Gleichzeitig treten DIMAP^{•-}-Banden im Wellenlängenbereich zwischen

$\lambda = 450 \text{ nm}$ und $\lambda = 650 \text{ nm}$ auf. Zusätzlich ist ein schwacher Anstieg der Absorption bei $\lambda = 750 \text{ nm}$ zu erkennen (Abb. 109 links). Vergleicht man die Spektren des reduzierten DIMAPdU mit denen von DIMAP stellt man fest, dass die Absorptionsbanden im Bereich von $\lambda = 500 \text{ nm}$ und $\lambda = 750 \text{ nm}$ wohl dem lokalisierten DIMAP^{•-}-Radikal zuzuordnen sind. Die breite Bande zwischen 550 nm und 650 nm wird in der Literatur auch für 2PydU (nicht jedoch für 1PydU) beschrieben.^[323]

Die Oxidation von DIMAPdU zum entsprechenden Radikalkation beginnt bereits bei einem Potential von +750 mV. Die Bildung des DIMAPdU^{•+}-Radikals zeigt sich anhand des Abfalls der DIMAPdU-Absorptionsbanden bei $\lambda = 295 \text{ nm}$ und $\lambda = 365 \text{ nm}$ und des Anstiegs des Radikalabsorptionsbande bei $\lambda = 400 - 550 \text{ nm}$. Gemäß den Spektren der DIMAP-Oxidation (vgl. Abb. 108 rechts) lässt sich die Bande dem lokalisierten DIMAP^{•+}-Radikal zuordnen.

Die Ähnlichkeit zwischen DIMAP und DIMAPdU in den spektroelektrochemischen Messungen stützt die Annahme, dass, wenn überhaupt, nur eine schwache elektronische Kopplung zwischen dem Chromophor und der Base vorliegt.

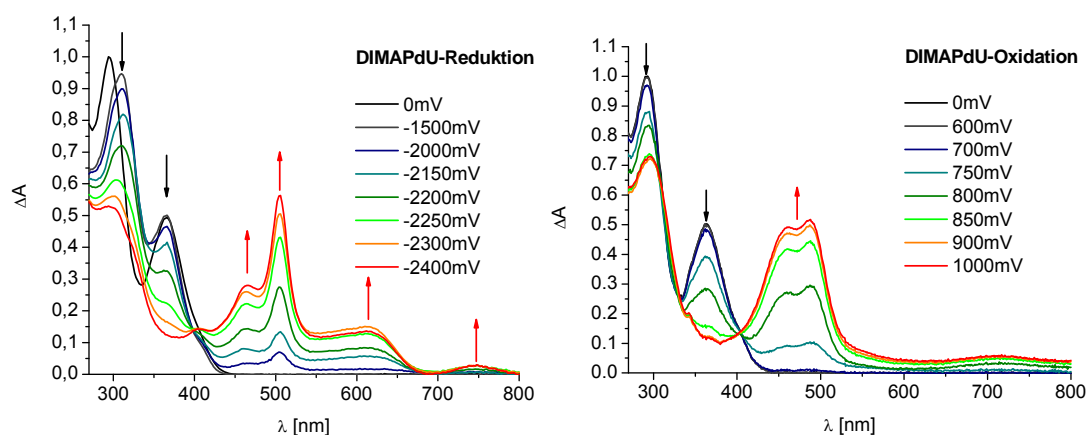


Abb. 109: Spektroelektrochemische Absorptionsmessungen für DIMAPdU; links: Reduktion, rechts: Oxidation; LM: DMF, Leitsalz: 150 mM TBAHFP;

Transiente Absorptionsmessungen

Um mehr über das Verhalten von DIMAP und DIMAPdU im angeregten Zustand zu erfahren, wurden transiente Absorptionsmessungen vorgenommen. Die gezeigten Messungen wurden in Zusammenarbeit mit der Gruppe von *Fiebig* durchgeführt.

Man erkennt in den transienten Absorptionsspektren für DIMAP in den ersten 300 fs nach dem Anregungspuls die Ausbildung einer positiven Bande zwischen $\lambda = 470$ nm und $\lambda = 600$ nm und einer negativen Bande zwischen $\lambda = 420$ nm und $\lambda = 470$ nm (Abb. 110 links). Das positive Signal entspricht der Absorption des angeregten $^1S^*$ -Zustands^[346] (DIMAP*) und wird durch Population dieses Zustands nach dem Anregungspuls erzeugt. Das negative Signal kommt durch stimulierte Emission aus dem angeregten Zustand zustande. In der Folge nehmen sowohl das Absorptionssignal des angeregten Zustands, als auch das Signal der stimulierten Emission ab (Abb. 110 rechts). Grund dafür ist die Depopulierung des angeregten Zustands durch Relaxation in den Grundzustand. Aus Abb. 110 kann man entnehmen, dass die Relaxation in den Grundzustand relativ langsam verläuft. Tatsächlich dauert es mehrere Nanosekunden bis der angeregte Zustand etwa zur Hälfte depopuliert ist. Dies steht im Einklang mit den Fluoreszenzlebenszeiten von 1-Aminopyren^[347] und transienten Absorptionsmessungen von *Lewis* und *Fiebig* für ein anderes Aminopyren-Derivat.^[346] Dadurch lässt sich auch die starke Emission von DIMAP erklären, da offensichtlich keine schnellen strahlungslosen Relaxationsprozesse auftreten.

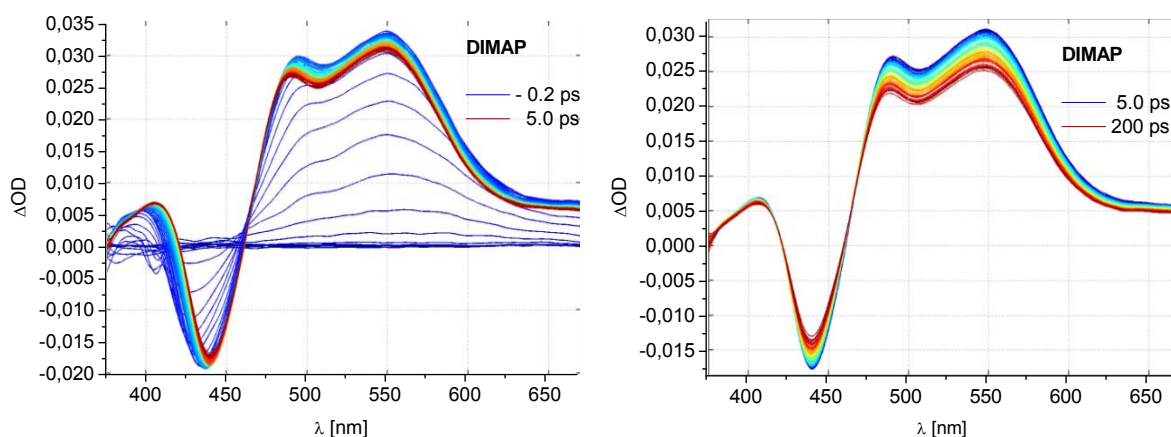


Abb. 110: Zeitaufgelöste Absorptionsmessungen von DIMAP in MeCN gemessen bei einer optischen Dichte von 0.75; links: Zeitskala von -0.2 ps (blau) bis 5.0 ps (dunkelrot) nach dem Anregungspuls ($\lambda_{\text{ex}} = 363$ nm); rechts: Zeitskala von 5.0 ps (blau) bis 200 ps (dunkelrot) nach dem Anregungspuls ($\lambda_{\text{ex}} = 363$ nm).

In den transienten Absorptionsmessungen für DIMAPdU (Abb. 111) erkennt man, dass sich während der ersten ca. 100 fs eine positive Bande im Wellenlängenbereich zwischen $\lambda = 470 \text{ nm} - 600 \text{ nm}$ ausbildet, die der Absorptionsbande des $^1\text{S}^*$ -Zustandes von DIMAP (DIMAP * -dU) entspricht. Diese geht allerdings in weniger als 2 ps in eine breite blauverschobene Bande über, die vermutlich der Absorptionsbande eines nicht-emittierenden ladungsgetrennten Zustands (DIMAP $^{*+}$ -dU $^{-}$) entspricht. Die Depopulierung des ladungsgetrennten Zustands durch Ladungsrekombination läuft auf einer wesentlich schnelleren Zeitskala ab als dies für den $^1\text{S}^*$ -Zustand des DIMAP der Fall ist. Bereits nach etwa 50 ps ist etwa die Hälfte der Moleküle in den Grundzustand relaxiert. Die schnelle und offensichtlich nahezu quantitative Ausbildung des DIMAP $^{*+}$ -dU $^{-}$ -Zustands (kein transientes Signal des lokal angeregten Zustands mehr zu sehen) erklärt auch die sehr stark verminderte Emission für DIMAPdU gegenüber DIMAP.

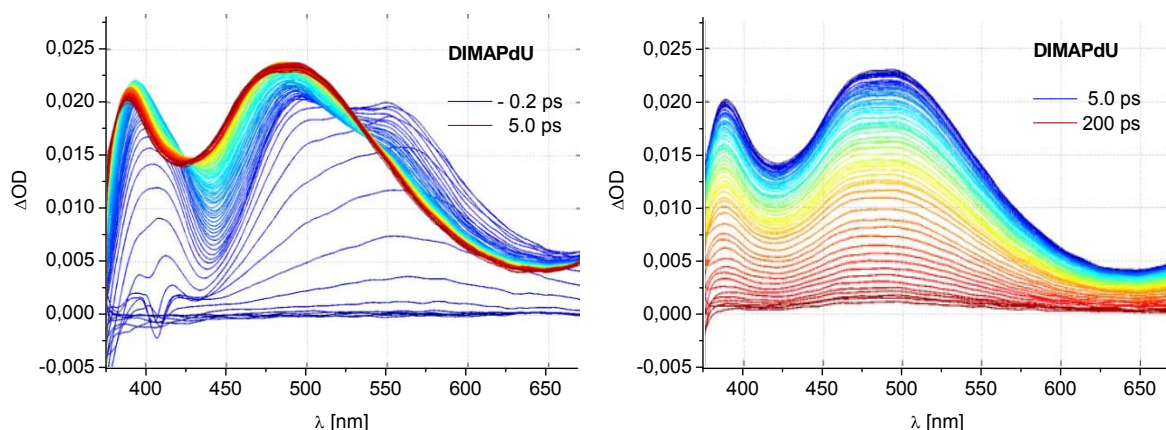


Abb. 111: Zeitaufgelöste Absorptionsmessungen von DIMAPdU in MeCN gemessen bei einer optischen Dichte von 0.7; links: Zeitskala von -0.2 ps (blau) bis 5.0 ps (dunkelrot) nach dem Anregungspuls ($\lambda_{\text{ex}} = 363 \text{ nm}$); rechts: Zeitskala von 5.0 ps (blau) bis 200 ps (dunkelrot) nach dem Anregungspuls ($\lambda_{\text{ex}} = 363 \text{ nm}$).

6.4 Untersuchung von DIMAPdU-modifizierten Oligonukleotiden

Zunächst sollte grundsätzlich der Einfluss der DNA auf die spektroskopischen Eigenschaften von DIMAPdU untersucht werden. Dazu wurden zwei Oligonukleotide, die DIMAPdU in unterschiedlicher Basenumgebung enthielten, synthetisiert.

DIMAP-DNA1 '3-A-G-T-C-A-C-T-T-**X**-T-T-C-T-G-A-C-G-5'

DIMAP-DNA2 '3-A-G-T-C-A-C-T-G-**X**-G-T-C-T-G-A-C-G-5'

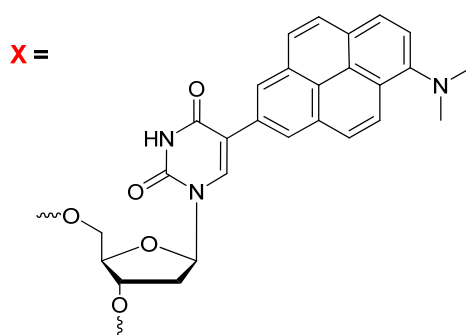


Abb. 112: DIMAPdU-modifizierte Oligonukleotide **DIMAP-DNA1** und **DIMAP-DNA2**

Soweit nicht durch den Zusatz ss (*single stranded*) gekennzeichnet, wurden alle Messungen an doppelsträngigen Oligonukleotiden durchgeführt. Für alle Messungen wurden vollständig komplementäre Gegenstränge verwendet, die Gegenbase des modifizierten Bausteins ist jeweils angegeben.

In den Absorptionsspektren für die Oligonukleotide **DIMAP-DNA1** und **DIMAP-DNA2** lassen sich keine gravierenden Unterschiede in Abhängigkeit von den Nachbarbasen oder Gegenbasen der Modifikation erkennen. Auch der Unterschied zwischen doppelsträngigen und einzelsträngigen Oligonukleotiden ist vernachlässigbar. Die Absorptionsmaxima aller Stränge liegen im Bereich zwischen $\lambda = 357 \text{ nm} - 363 \text{ nm}$ (Abb. 113).

In den Emissionsspektren für **DIMAP-DNA1** (Abb. 113 rechts oben) lässt sich tendenziell erkennen, dass im Falle von A oder T als Gegenbase die Emission etwas geringer ist als bei G oder C. Ein signifikanter Unterschied zwischen Einzel- und Doppelstrang lässt sich nicht beobachten. In den Emissionsspektren von **DIMAP-DNA2** (Abb. 113 rechts unten) lässt sich keinerlei Tendenz erkennen. Im Gegensatz zu DIMAPdU (Abb. 107) zeigen alle Oligonukleotide eine Aufspaltung der

Emissionsbande. Die Emissionsmaxima liegen im Bereich von $\lambda = 406$ nm, mit einer ausgeprägten Schulter im Bereich von $\lambda = 428$ nm und einer weiteren Schulter bei $\lambda = 450$ nm. Die Schultern sind in den Duplexen stärker ausgeprägt als in den Einzelsträngen. Zusätzlich kommt es zu einer signifikanten Blauverschiebung ($\Delta\lambda = \text{ca. } 50$ nm) des Emissionsmaximums gegenüber dem freien Farbstoff (Tabelle 14). Dazu ist zu sagen, dass sowohl die Absorption, als auch die Emission in allen Fällen sehr gering ist und daher detaillierte Aussagen schwierig sind. Festzuhalten bleibt aber folgendes:

- Die Absorptionseigenschaften von DIMAPdU werden durch den Einbau in Oligonukleotide nicht signifikant verändert.
- Die ohnehin geringe Emission von DIMAPdU wird durch den Einbau in Oligonukleotide zwar etwas verringert, aber nicht vollständig gelöscht.
- Durch den Einbau in Oligonukleotide kommt es zu einer Strukturierung und einer hypsochromen Verschiebung der Emission.

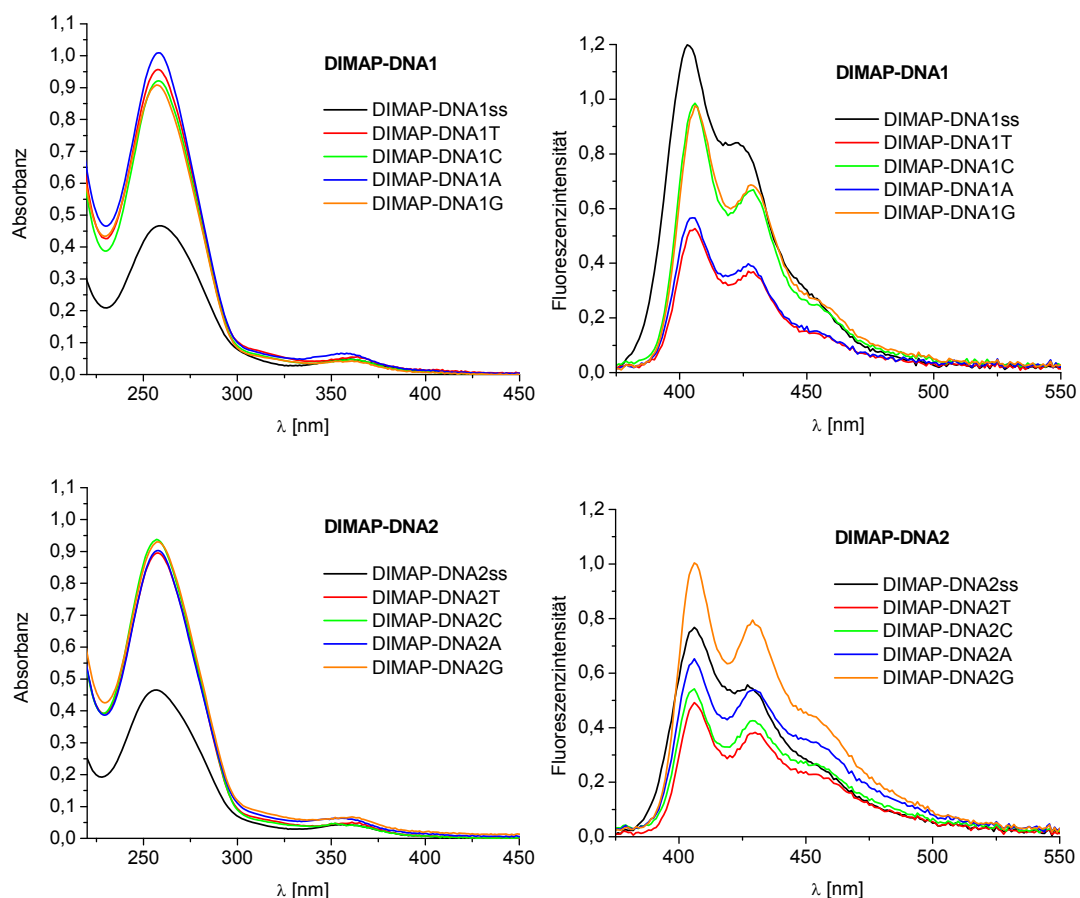


Abb. 113: Absorptions- (links) und Emissionsspektren (rechts) der DIMAPdU-modifizierten Oligonukleotide **DIMAP-DNA1** und **DIMAP-DNA2** ($\lambda_{\text{ex}} = 357$ nm, slits: 7nm).

Um das Auftreten der strukturierten Emissionsbande näher zu untersuchen, wurden temperaturabhängige Fluoreszenzspektren von DIMAPdU, **DIMAP-DNA1ss**, **DIMAP-DNA2ss**, **DIMAP-DNA1A** und **DIMAP-DNA2A** aufgenommen. In Abb. 114 sind exemplarisch die Spektren für DIMAPdU, **DIMAP-DNA2ss** und **DIMAP-DNA2A** gezeigt.

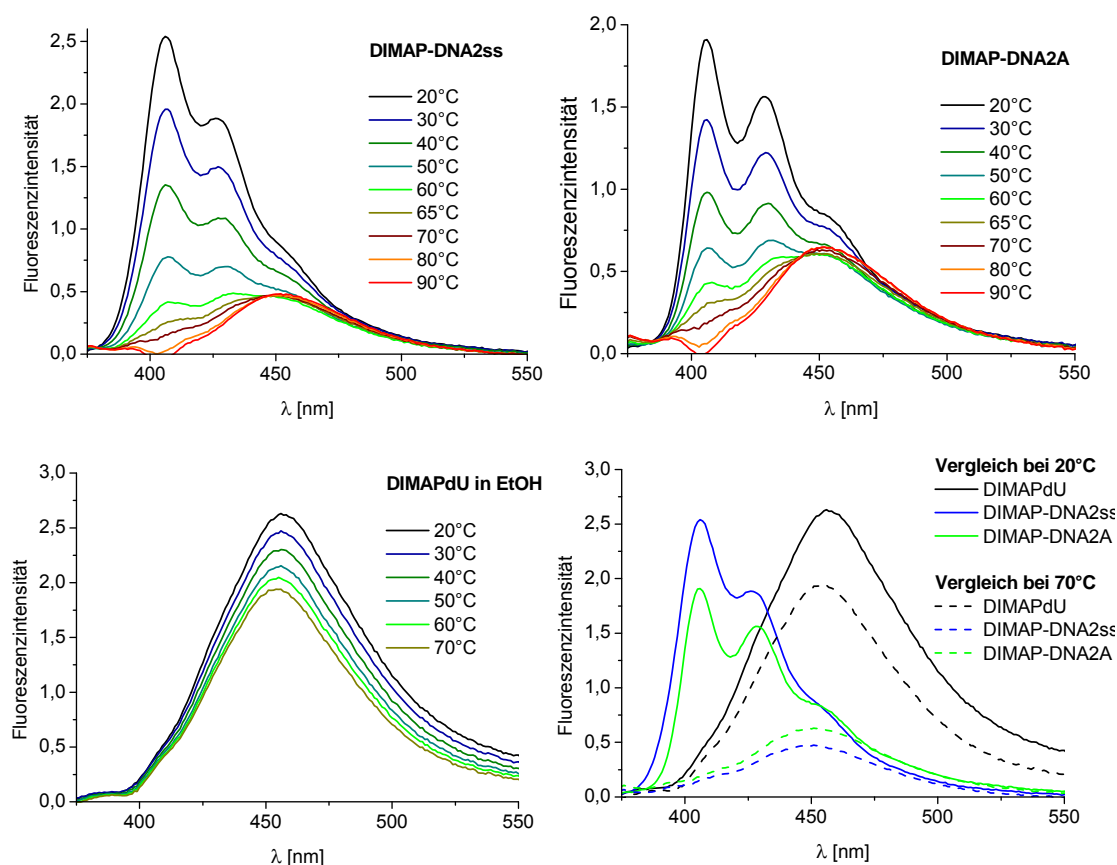


Abb. 114: Temperaturabhängige Fluoreszenzmessungen von DIMAPdU in EtOH (unten, $c = 2.5 \mu\text{M}$) und der Oligonukleotide **DIMAP-DNA2ss** und **DIMAP-DNA2A** (oben, $c = 10 \mu\text{M}$), sowie der Vergleich der Emissionen bei 20°C und 70°C (unten rechts).

Bei Vergleich der Messungen für das Nukleosid (Abb. 114 unten) und die Oligonukleotide (Abb. 114 oben) ist eine deutlich unterschiedliche Temperaturabhängigkeit der Emission zu erkennen. Während die Emission des Nukleosids bei einer Temperaturerhöhung von 20°C auf 70°C nur leicht abnimmt und sich die Form der Emissionsbande nicht ändert, ist für die Oligonukleotide eine starke Emissionsabnahme und eine drastische Änderung der Bandenform zu sehen. Interessanterweise geht die Strukturierung der Emissionsbande der Oligonukleotide bei höheren Temperaturen verloren und die Emission ähnelt stark der des freien

Nukleosids (Abb. 114 unten rechts). Das dies keine Folge der Dehybridisierung des Oligonukleotidduplexes ist, wird beim Vergleich der Spektren von **DIMAP-DNA2ss** und **DIMAP-DNA2A** (Abb. 114 oben) deutlich. Die Temperaturabhängigkeit der Emission ist in beiden Fällen beinahe identisch.

Interpretieren lassen sich die Ergebnisse dahingehend, dass im Nukleosid vermutlich eine freie Drehbarkeit um die Chromophor-dU C-C-Einfachbindung vorliegt. Es wird sich folglich die energetisch günstigste Gleichgewichtskonformation einstellen. In den Oligonukleotiden ist diese freie Drehbarkeit nicht mehr gegeben, da der Chromophor durch die DNA-Überstruktur in eine bestimmte Orientierung zum dU gezwungen wird. Dadurch kommt es zu einer geänderten elektronischen Kopplung zwischen Chromophor und dU und somit zu einem geänderten Emissionsverhalten. Mit steigender Temperatur nimmt die Dynamik und Flexibilität innerhalb der Oligonukleotidstruktur zu und die thermische Energie reicht aus, um die Rotationsbarriere zu überwinden. Dadurch wird die Drehbarkeit um die Chromophor-dU Bindung wieder ermöglicht. Die Form der Emissionsbande der Oligonukleotide gleicht daher bei höheren Temperaturen der des Nukleosids. Die Unterschiede in der Fluoreszenzintensität zwischen freiem DIMAPdU und DIMAPdU in Oligonukleotiden sind vermutlich auf Elektronentransferprozesse von photoangeregtem DIMAPdU auf die Pyrimidinbasen zurückzuführen. Zumindest legen die ermittelten Potentiale für DIMAPdU im angeregten Zustand dies nahe.

Um die Basenpaarungseigenschaften von DIMAPdU zu studieren, wurden die Schmelztemperaturen für die Duplexe von **DIMAP-DNA1** und **DIMAP-DNA2** mit allen vier natürlichen Gegenbasen bestimmt. Es zeigt sich, dass keine erhöhte Schmelztemperatur im Falle der „korrekten“ Gegenbase Adenin auftritt (Tabelle 15). Es bildet sich also keine bevorzugte Watson-Crick-Basenpaarung aus. Ähnliche Ergebnisse wurden in unserer Arbeitsgruppe auch für die pyrenmodifizierten Uridine 1PydU und 2PydU erhalten.^[180] Der destabilisierende Effekt fällt allerdings, verglichen mit anderen Modifikationen an der 5-Position des Uridins, eher gering aus.^[348] Wahrscheinlich kann der DIMAP-Chromophor zumindest teilweise in den Basenstapel interkalieren und somit den Wegfall der kanonischen Basenpaarung zum Teil kompensieren.

Tabelle 15: Schmelztemperaturen der mit DIMAPdU modifizierten Duplexe mit unterschiedlichen Gegenbasen; die ΔT_m -Werte beziehen sich jeweils auf unmodifizierte, vollständig komplementäre Duplexe, die T anstelle von DIMAPdU enthalten; die T_m -Werte der Referenzduplexe liegen bei 62.5°C und 68°C.^[62]

Duplex	T_m [°C]	ΔT_m [°C]	Duplex	T_m [°C]	ΔT_m [°C]
DIMAP-DNA1T	57.7	-4.8	DIMAP-DNA2T	61.6	-6.4
DIMAP-DNA1C	56.7	-5.8	DIMAP-DNA2C	59.0	-9.0
DIMAP-DNA1A	55.7	-6.8	DIMAP-DNA2A	59.8	-8.2
DIMAP-DNA1G	55.5	-7.0	DIMAP-DNA2G	58.2	-9.8

Um Informationen über den angeregten Zustand von DIMAPdU in Oligonukleotiden zu erhalten, wurden für **DIMAP-DNA1A** und **DIMAP-DNA2A** transiente Absorptionsmessungen durchgeführt. Da die Ergebnisse (Abb. 115) sich kaum unterscheiden, werden sie im Folgenden gemeinsam diskutiert. Man erkennt, dass sich während der ersten etwa 300 fs eine Absorptionsbande bei $\lambda = 500$ nm und eine bei $\lambda = 390$ nm entwickeln, die in ihren Formen und ihren Intensitätsverhältnissen etwa den für DIMAPdU beobachteten Banden entsprechen (vgl. Abb. 111 links). In der Folge nimmt allerdings zunächst nur die Intensität der kurzwelligen Bande ab. Geht man davon aus, dass sich während der ersten 300 fs der lokal ladungsgetrennte Zustand ($\text{DIMAP}^{++}\text{dU}^{\bullet-}$) ausbildet und es in der Folge zu einer Migration des Elektrons vom $\text{dU}^{\bullet-}$ auf andere DNA-Basen und zur Ausbildung eines $\text{DIMAP}^{++}\text{dU}$ -Zustands kommt, so lassen sich die Veränderungen der Banden erklären. Nach etwa 2 ps ist die Ladungsmigration im Gleichgewicht und das Absorptionsspektrum verändert seine Form fortan nicht mehr. Unterstützt wird diese Vermutung durch die spektroelektrochemischen Messungen zur Oxidation von DIMAPdU (vgl. Abb. 109), da die Absorption des dort erzeugten $\text{DIMAP}^{++}\text{dU}$ sehr ähnlich erscheint. Ab etwa 2 ps nach der Anregung kommt es zu einem Absinken der Absorption durch Depopulierung des $\text{DIMAP}^{++}\text{dU}$ -Zustands. Dies geschieht auf einer sehr schnellen Zeitskala, so dass bereits innerhalb von etwa 8 ps die Hälfte der Moleküle in den Grundzustand relaxiert ist. Die schnelle Ausbildung des ladungsgetrennten Zustands erklärt auch die geringe Emission der Oligonukleotide im Vergleich zu DIMAP.

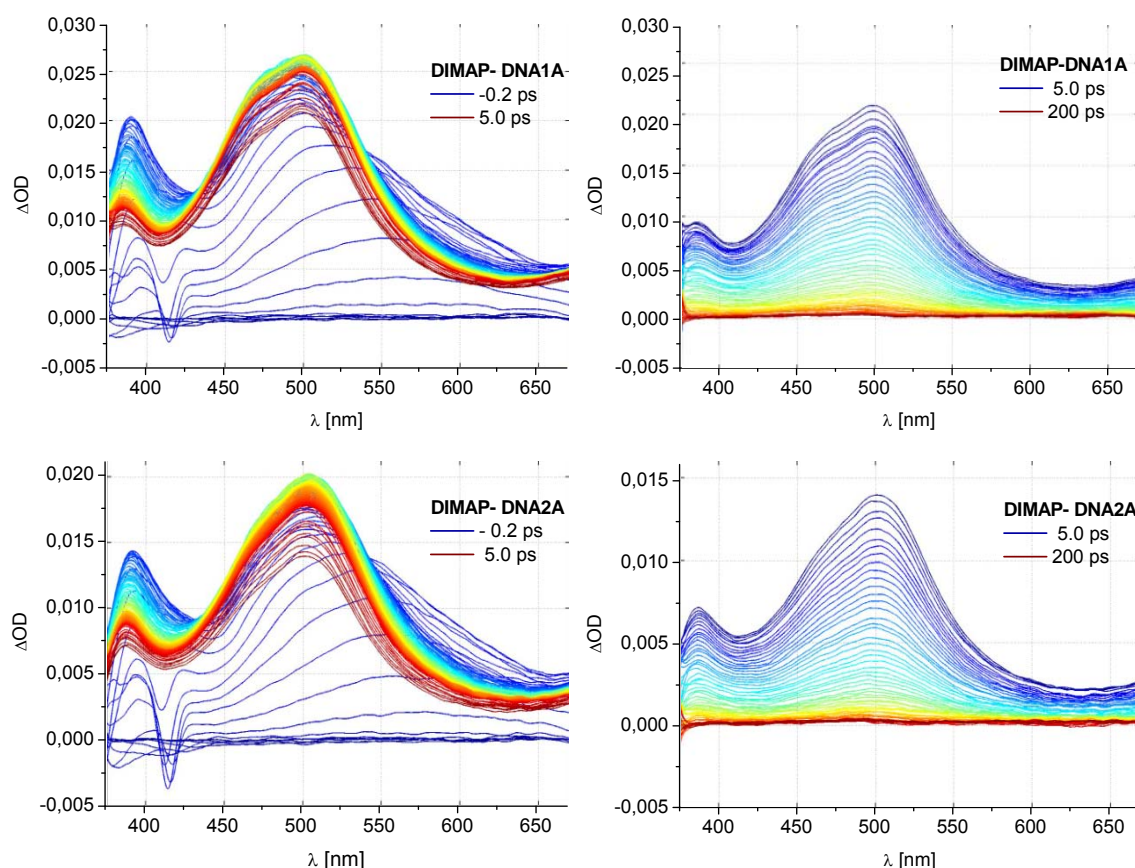


Abb. 115: Zeitaufgelöste Absorptionsmessungen von **DIMAP-DNA1A** (oben) und **DIMAP-DNA2A** (unten) gemessen bei einer optischen Dichte von 0.6; links: Zeitskala von -0.2 ps (blau) bis 5 ps (dunkelrot) nach dem Anregungspuls ($\lambda_{\text{ex}} = 363$ nm); rechts: Zeitskala von 5 ps (blau) bis 200 ps (dunkelrot) nach dem Anregungspuls ($\lambda_{\text{ex}} = 363$ nm).

6.5 Ladungstransferexperimente mit DIMAPdU als nukleosidischem Elektronendonator / Lochakzeptor

DNA vermittelte Elektronentransferprozesse stellen eine interessante Möglichkeit für den Aufbau von Nanodrähten oder nanoskalierten elektronischen Bauteilen dar. Dabei kann man sich entweder den Transport von Überschusselektronen (*excess electron transfer*, EET) oder von Elektronenfehlstellen (Löchern) durch die DNA zunutze machen. Der Lochtransfer (*hole transfer*, HT) ist allerdings mit einigen Einschränkungen für die Anwendungen in der Nanoelektronik behaftet. Dies sind vor allem oxidative Schädigungen der DNA und der relativ langsame Lochtransport in guaninhaltigen Oligonukleotidsequenzen. Der Transport von Überschusselektronen

verläuft hingegen ohne DNA-Schädigungen und unter Einbeziehung aller Basenpaare als intermediäre Ladungsträger.^[13, 95] Somit stellt der EET den vielversprechenderen Ansatz für die molekulare Elektronik dar. Daher sind Studien, die zu einem besseren Verständnis des EET in Oligonukleotiden führen, sowie neue Systeme, anhand derer der EET untersucht werden kann, für die Weiterentwicklung der Nanoelektronik interessant.

Erste Studien zum EET über mehrere Basenpaare wurden anhand der reduktiven Spaltung von Thymin-Dimeren mit reduzierten Flavinen als Elektronendonoren von *Carell et al.* durchgeführt.^[138, 177, 349, 350] Diese Studien zeigten, dass der EET nur wenig von der Basensequenz zwischen Elektronendonator und –akzeptor abhängig ist.^[137] In anderen Untersuchungen wurden die reduktive Spaltung eines Thyminoxetans^[351] oder Halogenabspaltungen infolge der Reduktion von 5-Bromouracil und 5-Iodouracil^[141, 174, 352-355] als chemischen Sonden für den Elektronentransfer verwendet. Allerdings gibt es nur wenige Studien, die sich mit der Dynamik und der Effizienz des EET in DNA befassen.^[175, 179, 346, 356]

Die Eigenschaften von photoangeregtem Pyren als Elektronendonator für den EET in DNA wurden bereits von diversen Gruppen untersucht.^[356-358] Auch pyrenmodifizierte Nukleoside wurden v.a. in den Arbeitsgruppen von *Netzel*^[313, 314, 322, 359, 360] und *Wagenknecht*^[97, 180, 361-364] studiert. Zu den Eigenschaften von Aminopyrenen als Elektronendonoren für den DNA-vermittelten Elektronentransfer gibt es hingegen sehr wenige^[346, 365] und zu aminopyrenmodifizierten Nukleosiden überhaupt keine Studien. Untersuchungen von *Ito* und *Rokita* zeigen, dass aromatische Amine sich als Elektronendonoren für den EET in DNA eignen.^[174, 352]

Im Rahmen dieser Arbeit sollte die Eignung von DIMAPdU als photoanregbarem Elektronendonator und als Lochakzeptor im Grundzustand untersucht werden. Dazu wurden drei unterschiedliche Elektronentransfersysteme entwickelt. Im ersten System findet ein Lochtransfer von photoangeregtem Nilrot auf DIMAPdU im Grundzustand statt. Im zweiten System dient angeregtes DIMAPdU als Elektronendonator und *N*-Phenylsulfonylindol als Elektronenakzeptor. Bei dem dritten System mit DIMAPdU und Dimethyldiazapyrenium (DAP^{2+}) kann entweder angeregtes DIMAPdU* als Elektronendonator und DAP^{2+} als Elektronenakzeptor, oder angeregtes DAP^{2+*} als Lochdonor und DIMAPdU als Lochakzeptor dienen. Dabei ist jeweils der angeregte Farbstoff für die Ladungsinjektion und der Chromophor im

Grundzustand für das Abfangen der Ladung verantwortlich. Die Experimente und die daraus erhaltenen Ergebnisse für die verschiedenen CT-Systeme werden in den folgenden Abschnitten erläutert.

6.5.1 Oxidativer Lochtransfer zwischen Nilrot und DIMAPdU

Der Nilrot-Chromophor wurde in der Arbeitsgruppe *Wagenknecht* bereits in Oligonukleotide eingebaut und in Kombination mit pyrenmodifizierten Nukleosiden für FRET-Experimente eingesetzt.^[366, 367] Allerdings wurden noch nie die Eigenschaften von photoangeregtem Nilrot als Lochdonor in DNA untersucht. *Mohanty et al.* publizierten 2003 eine auf Elektronentransferprozessen basierende Löschung der Nilrot-Fluoreszenz durch aminosubstituierte Aromaten.^[368] Aus den angegebenen Potentialen für Nilrot ($E_{\text{red}} = -1.01 \text{ V}$ vs SCE bzw. -0.77 V vs NHE) und der Energie des E_{00} -Übergangs von Nilrot (2.12 eV in MeCN) lässt sich nach der Rehm-Weller-Gleichung ein Reduktionspotential im angeregten Zustand von $E_{\text{red}}^* = 1.35 \text{ V}$ berechnen. Dieser Wert liegt im Grenzbereich für Guanin-Oxidationen ($E_{\text{ox}} = 1.3 \text{ V}$), sollte aber in jedem Fall ausreichen, um eine Oxidation von DIMAP ($E_{\text{ox}} = 0.91 \text{ V}$) und DIMAPdU ($E_{\text{ox}} = 0.88 \text{ V}$) zu ermöglichen. Dazu muss gesagt werden, dass es sich bei der Abschätzung der Potentiale im angeregten Zustand nur um eine Näherung handelt, und dass die Redoxpotentiale zusätzlich durch die DNA-Umgebung beeinflusst werden. In Vorversuchen konnte jedoch gezeigt werden, dass DIMAP in der Lage ist die Nilrot-Emission in Lösung zu löschen.

Ziel dieses Teilprojektes war es demnach, ein mit Nilrot modifiziertes Uridin (NRdU) nach einer Vorschrift von *Varghese et al.* zu synthetisieren und in Oligonukleotide einzubauen.^[366] Außerdem sollten Ladungstransferexperimente in mit NRdU und DIMAPdU modifizierten Duplexen durchgeführt werden. Dabei sollte die Distanzabhängigkeit des Ladungstransfers, sowie der Einfluss unterschiedlicher Basenpaare zwischen Lochdonor und –akzeptor untersucht werden.

Synthese des Lochdonors NRdU

Die Synthese des nilrotmodifizierten Phosphoramiditbausteins ist in der Literatur beschrieben.^[366, 369-371] Im ersten Schritt wird das Benzophenoxazin-Grundgerüst

durch Umsetzung von Diethylamino-2-nitrosophenol-Hydrochlorid mit 1,6-Dihydroxynaphthalin aufgebaut.^[369] Anschließend wird in **47** mittels Tf_2NPh die Triflat-Gruppe eingeführt (**48**), welche im nächsten Schritt in einer Sonogashira-Kupplung mit TMS-Acetylen zu **49** umgesetzt wird. Nach Entschützung der Acetylen-Gruppe von **49** mit TBAF wird das acetylenfunktionalisierte Nilrot-Derivat **50** erhalten.^[371] Dieses lässt sich in einer weiteren Sonogashira-Kupplung mit 5'-OH geschütztem 5-Iodo-2'-deoxyuridin zu **51** umsetzen. Der Synthese des Phosphoramidit-Bausteins **52** wird durch Umsetzung mit 2-Cyanoethoxy-*N,N*-diisopropylaminochlorophosphoramidit unter basischen Bedingungen erreicht.^[366] Das zugehörige Syntheschema ist in Abb. 116. dargestellt. Der Einbau in Oligonukleotide wurde mit einer 0.1 M Lösung von **52** in abs. MeCN/DCM (1:1) und einer auf 500 s verlängerten Kopplungszeit durch automatisierte Festphasensynthese erreicht.

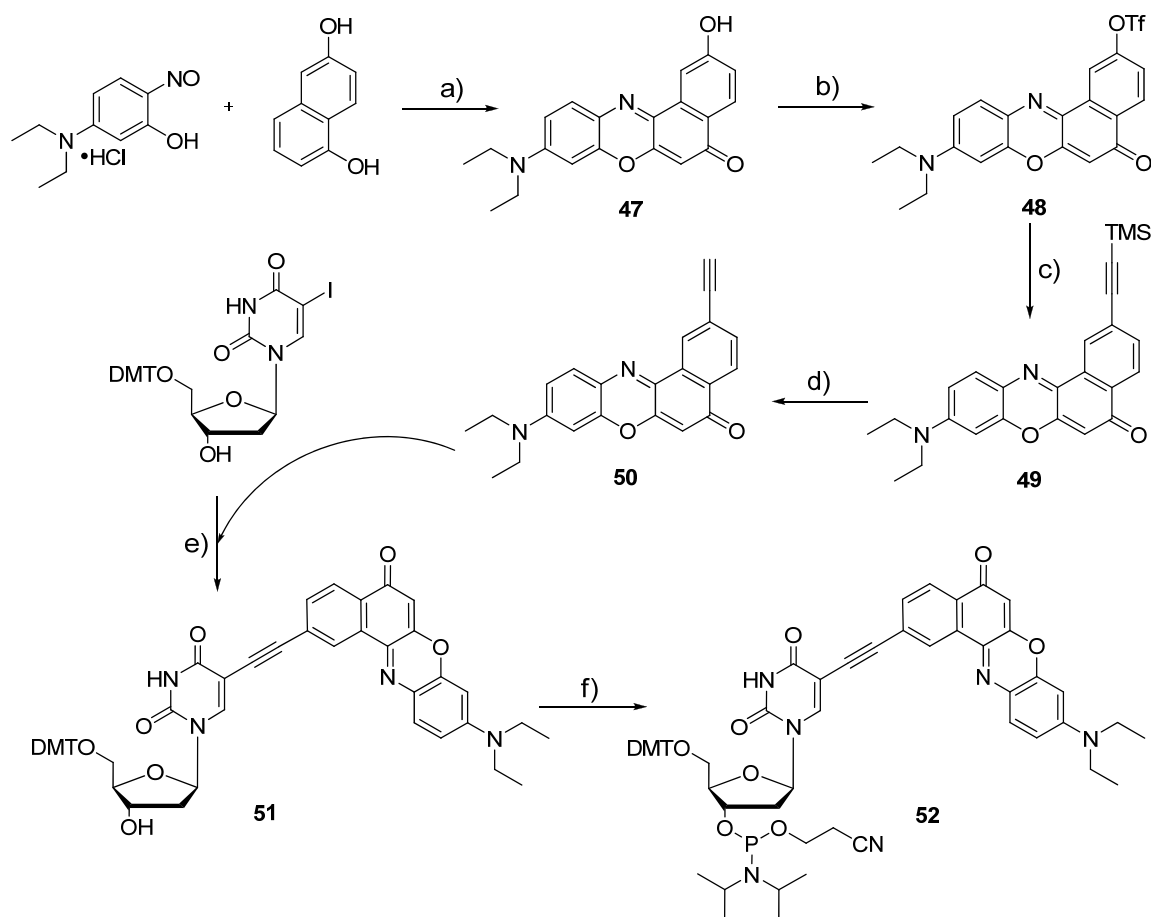


Abb. 116: Synthese von NRdU: **a)** DMF, 4 h, Rückfluss, 60%; **b)** Tf_2NPh / NEt_3 in abs. THF, 20h, RT, 67%; **c)** TMS-Acetylen, $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$, CuI, NEt_3 in abs DMF, 5 h, 80°C, 58%; **d)** TBAF in abs. DCM, 20 min, RT, 87%; **e)** $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$, CuI, NEt_3 in abs DMF, 5 h, 80°C, 53%; **f)** 2-Cyanoethoxy-*N,N*-diisopropylaminochlorophosphoramidit, DIPEA in abs. DCM, 4h, RT, 70%;

Lochtransferexperimente in DNA

Um den oxidativen Lochtransfer in DNA zu untersuchen, wurden die mit DIMAPdU modifizierten Oligonukleotide **DIMAP1 – DIMAP6** und die komplementären mit Nilrot modifizierten Oligonukleotide **NR1 – NR6** synthetisiert (vgl. Abb. 117). Die doppelt modifizierten Ladungstransferduplexe enthalten NRdU im einen und DIMAPdU im anderen Oligonukleotidstrang. Die Art (GC oder AT) und Anzahl (1 – 3) der dazwischen liegenden Basenpaare variiert von Duplex zu Duplex.

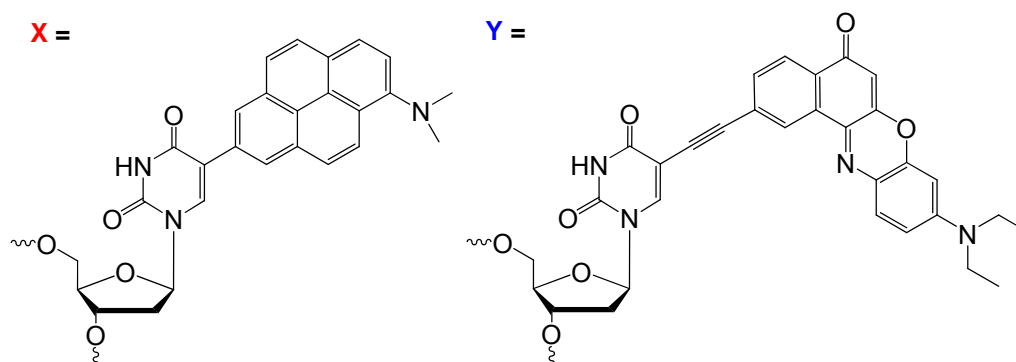
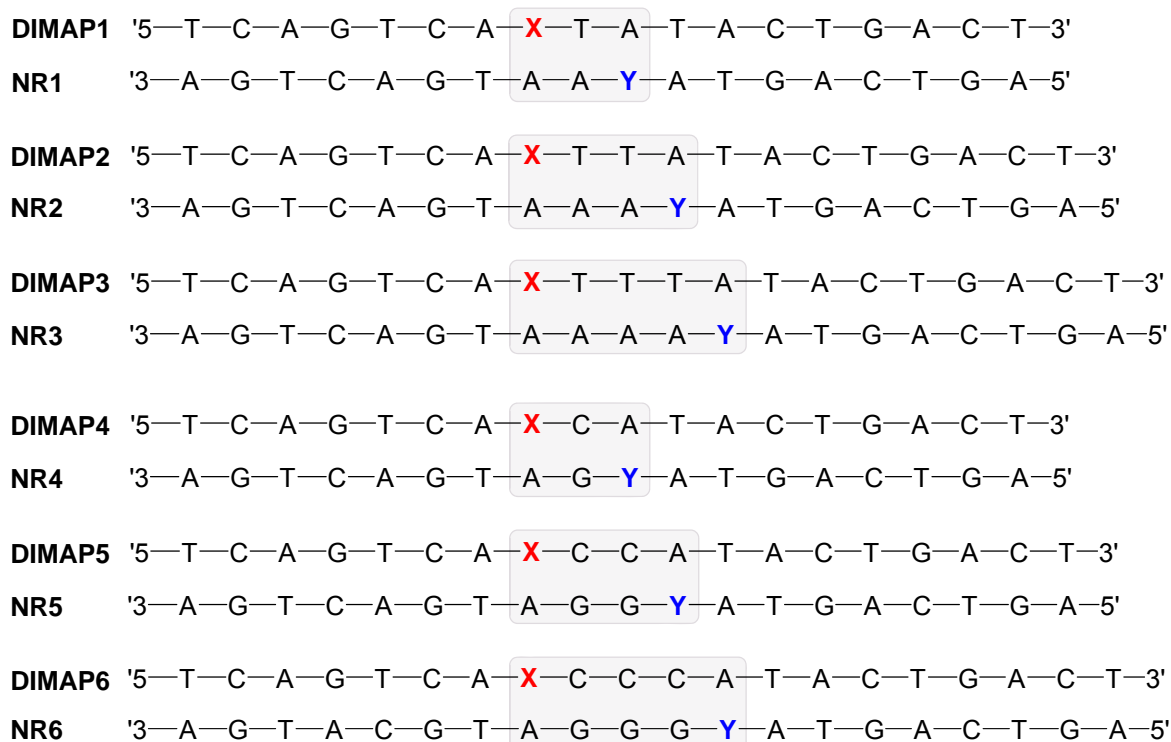


Abb. 117: Übersicht der Oligonukleotide zur Untersuchung des oxidativen Lochtransfers von NRdU auf DIMAPdU

Die im Folgenden dargestellten Messungen wurden alle an doppelsträngigen Oligonukleotiden durchgeführt. Soweit kein Gegenstrang angegeben ist, wurden vollständig komplementäre Gegenstränge mit A als Gegenbase zur Modifikation verwendet.

Es wurden Absorptions- und Emissionsspektren der Duplexe **NR1 – NR6**, **DIMAP1 – DIMAP6** und **NR1/DIMAP1 – NR6/DIMAP6** aufgenommen. Da die DIMAP-Emission in diesem Kapitel nicht von Bedeutung ist, wird auf die Spektren der mit DIMAPdU modifizierten Oligonukleotide nicht weiter eingegangen. Sie werden stattdessen im folgenden Kapitel diskutiert (Kapitel 6.5.2). In Abb. 118 sind exemplarisch die Absorptionsspektren eines mit NRdU und DIMAPdU modifizierten Duplexes (**NR2/DIMAP2**), sowie der zugehörigen einfach modifizierten Duplexe (**NR2** und **DIMAP2**) dargestellt. Man erkennt für **NR2/DIMAP2** deutlich die Überlagerung der Absorption der beiden Chromophore. Im Wellenlängenbereich $\lambda = 500 \text{ nm} - 700 \text{ nm}$ kann der Nilrot-Chromophor selektiv angeregt werden. Eine selektive Anregung des DIMAP-Chromophors ist nicht möglich. Abb. 118 zeigt ebenfalls die Emissionsspektren der nilrotmodifizierten Duplexe **NR1 – NR6**. Alle sechs Oligonukleotide zeigen eine starke Emission, die für die Oligonukleotide mit benachbarten GC Basenpaaren (**NR4 – NR6**) allenfalls leicht verringert ist. Es sieht so aus, als würde keine Guanin-Oxidation durch photoangeregtes Nilrot stattfinden.

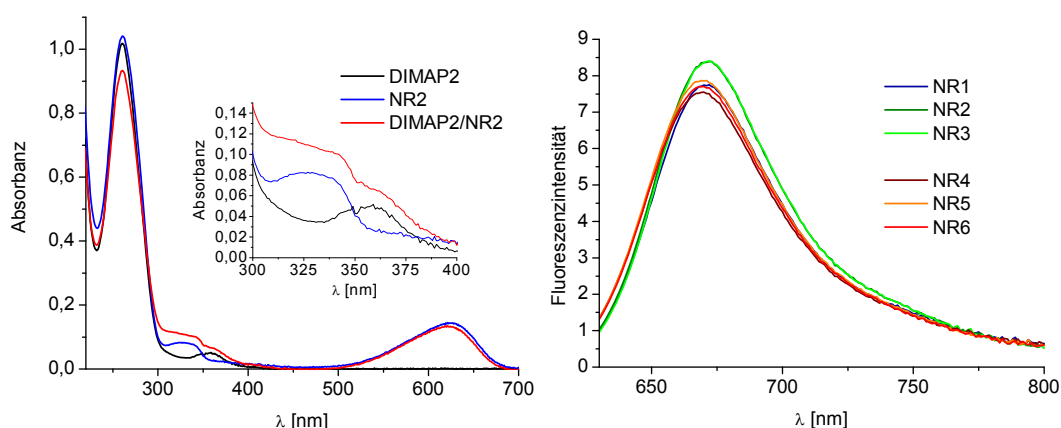


Abb. 118: links: Absorptionsspektren der einfach modifizierten Oligonukleotid-Duplexe **DIMAP2** und **NR2**, sowie des Ladungstransfer-Duplexes **NR2/DIMAP2**; rechts: Emission der nilrotmodifizierten Duplexe **NR1 – NR6** ($\lambda_{\text{ex}} = 620 \text{ nm}$).

Um den photoinduzierten Lochtransfer zwischen angeregtem Nilrot und DIMAP im Grundzustand zu untersuchen, muss man die Emissionsspektren der doppelt

modifizierten Oligonukleotide betrachten (Abb. 119). Tritt ein Ladungstransferprozess auf, so wird durch den zusätzlichen strahlungslosen Relaxationsweg aus dem angeregten Zustand die Nilrot-Emission verringert. Findet ein solcher Ladungstransfer durch den DNA-Basenstapel statt, so ist die Rate des Ladungstransfers von der Anzahl und Art der Basenpaare zwischen Donor und Akzeptor abhängig. Die Emissionslöschung sollte demnach mit steigendem Abstand zwischen NRdU und DIMAPdU abnehmen.

Ein Vergleich der Emissionsspektren von **NR1 – NR6** mit denen der zugehörigen HT-Duplexe **NR1/DIMAP1 – NR6/DIMAP6** ist in Abb. 119 dargestellt. Die entsprechenden Fq-Werte für die integrierte Fluoreszenz sind in Tabelle 16 aufgelistet. Für die Duplexe **NR1/DIMAP1 – NR3/DIMAP3** (Abb. 119 links), bei denen sich zwischen NRdU und DIMAPdU ein bis drei AT Basenpaare befinden, ist die Emission wider Erwarten im Falle von **NR2/DIMAP2** stärker verringert als die von **NR1/DIMAP1**. Im Falle von **NR3/DIMAP3** lässt sich nur noch sehr wenig Emissionslöschung feststellen. Für **NR4/DIMAP4 – NR6/DIMAP6** (Abb. 119 rechts) lässt sich Ähnliches beobachten.

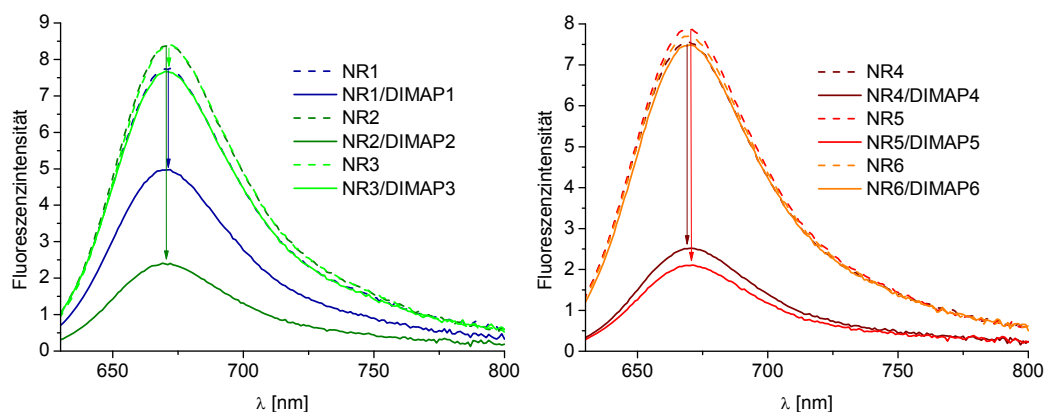


Abb. 119: Löschung der Nilrot Emission innerhalb der Ladungstransferduplexe mit AT (links) und GC (rechts) Basenpaaren zwischen NRdU und DIMAPdU ($\lambda_{\text{ex}} = 620\text{nm}$).

Um diese Beobachtung zu interpretieren, gibt es zwei Möglichkeiten. Die Erste ist, dass es sich nicht um einen Ladungstransfer durch den Basenstapel handelt, sondern um einen direkten Ladungstransfer. Dabei müssten die Chromophore sich so ausrichten, dass eine Orbitalwechselwirkung möglich ist. Die zweite, aufgrund der Ergebnisse plausiblere Möglichkeit, gründet auf einer Störung der Basenpaarung im Bereich zwischen den Chromophoren. Dabei wird die DNA-Struktur durch die beiden

Modifikationen in räumlicher Nähe so stark gestört, dass auch Basenpaarungen in unmittelbarer Umgebung beeinflusst werden. Im konkreten Fall bedeutet dies, dass ein Basenpaar zwischen NRdU und DIMAPdU nicht ausreicht, um in diesem Bereich einen stabilen Duplex auszubilden. Da aber die Basenpaarungen für die π - π Orbitalüberlappung und somit für die Effizienz des Ladungstransfers von entscheidender Bedeutung sind, wird durch solch strukturelle Störungen die Ladungstransfereffizienz verringert (vgl. 3.3.2. „Strukturelle Faktoren“). Unterstützt wird diese Vermutung durch den Unterschied in den Fq-Werten für **NR1/DIMAP1** und **NR4/DIMAP4**, da hier die Art der Basenpaarung offensichtlich für die Ladungstransfereffizienz entscheidend ist. Es scheint, als könnte durch die stärkere GC-Paarung die lokale Störung der Struktur besser kompensiert werden. Für den HT über zwei und drei Basenpaare zeigen sich keine signifikanten Unterschiede in Abhängigkeit von der Art der Basenpaare zwischen NRdU und DIMAPdU.

Um diese Vermutung zu untermauern, wären allerdings Lebenszeitmessungen und die Bestimmung von Ladungstransferraten durch transiente Absorptionsmessungen essentiell, da man anhand statischer Fluoreszenzmessungen durch die Emissionslöschung nur die Ausbildung des nicht-emittierenden ladungsgetrennten Zustands beobachten kann. Aussagen über die Dynamik der am Ladungstransfer beteiligten Prozesse sind aus solchen Messungen nicht möglich.

Tabelle 16: Fq-Werte für die Emissionslöschung der NR/DIMAP-Duplexe. Als Referenz wurde jeweils die Emission der entsprechenden NR-Oligonukleotide ohne Lochakzeptor verwendet.

Duplex	Fq [%]	Duplex	Fq [%]
NR1 / DIMAP1	37	NR4 / DIMAP4	68
NR2 / DIMAP2	72	NR5 / DIMAP5	73
NR3 / DIMAP3	8	NR6 / DIMAP6	4

Um die Duplexstabilitäten genauer zu untersuchen, wurden die Schmelztemperaturen für die Duplexe **NR1 – NR6**, **DIMAP1 – DIMAP6** und **NR1/DIMAP1 – NR6/DIMAP6** bestimmt (Tabelle 17).

Man erkennt, dass sowohl DIMAPdU, als auch NRdU Oligonukleotid-Duplexe destabilisieren. Interessanterweise zeigt sich für die HT-Duplexe (**NR1/DIMAP1 – NR3/DIMAP3** und **NR4/DIMAP4 – NR6/DIMAP6**) keine Erhöhung der T_m -Werte mit steigender Anzahl an Basenpaaren zwischen NRdU und DIMAPdU.

Tabelle 17: Schmelztemperaturen der Duplexe **DIMAP1 – 6**, **NR1 – 6** und **DIMAP1/NR1 – DIMAP6/NR6**; die ΔT_m -Werte beziehen sich jeweils auf unmodifizierte, vollständig komplementäre Duplexe, die T anstelle der Modifikationen enthalten;

Duplex	T_m [°C]	ΔT_m [°C]	Duplex	T_m [°C]	ΔT_m [°C]
DIMAP1	56.8	-2.8	DIMAP4	57.8	-4.9
DIMAP2	56.8	-4.2	DIMAP5	60.2	-5.4
DIMAP3	56.6	-4.8	DIMAP6	62.7	-5.2
NR1	55.3	-4.3	NR4	57.9	-4.8
NR2	56.2	-4.8	NR5	60.4	-5.2
NR3	57.6	-3.8	NR6	63.4	-4.5
NR1 / DIMAP1	58.6	-1.0	NR4 / DIMAP4	59.0	-3.7
NR2 / DIMAP2	59.1	-1.9	NR5 / DIMAP5	58.3	-7.3
NR3 / DIMAP3	56.0	-5.4	NR6 / DIMAP6	59.0	-8.9

Im Falle eines DNA-vermittelten Ladungstransfers sollte die Emissionslöschung mit der Dehybridisierung des Duplexes einhergehen. Um dies zu untersuchen wurden temperaturabhängige Fluoreszenzmessungen durchgeführt. Als Referenz zu jedem Ladungstransferstrang wurde der entsprechende, nur mit NRdU modifizierte Duplex gemessen. Exemplarisch werden hier nur die Spektren von **NR5** und **NR5/DIMAP5** gezeigt und diskutiert.

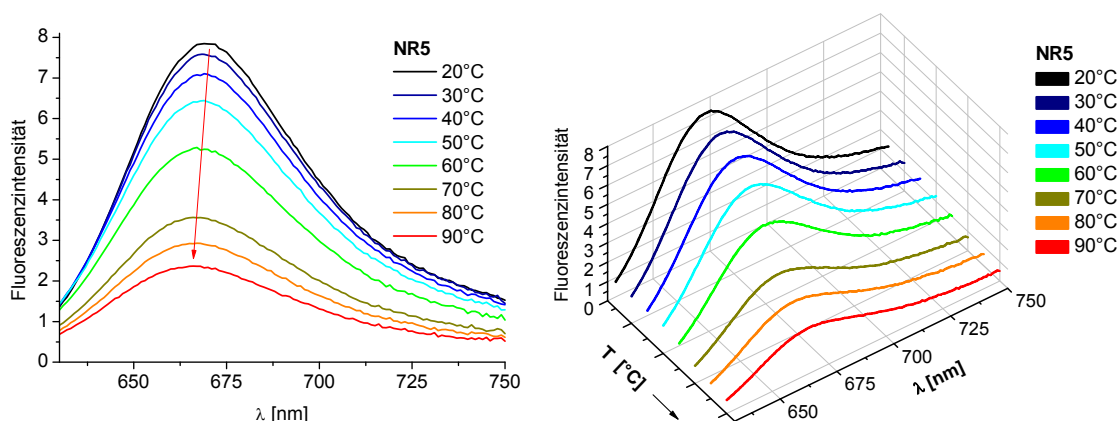


Abb. 120: Temperaturabhängige Fluoreszenzmessungen für **NR5**

Die Emission des Duplexes **NR5** (Abb. 120) zeigt die typische Temperaturabhängigkeit der Nilrot-Emission. Die starke Abnahme im Bereich von

$T = 60^\circ\text{C}$ kommt durch die Verringerung der Quantenausbeute im Einzelstrang im Vergleich zum Doppelstrang zustande.^[366]

Abb. 121 zeigt die Emission des Ladungstransferduplexes **NR5/DIMAP5** in Abhängigkeit von der Temperatur. Man erkennt zunächst ein Ansteigen der Emission bis zu einer Temperatur von 60°C ($T_m = 58.3^\circ\text{C}$), danach fällt die Emission ähnlich der von **NR5** ab. Der Anstieg der Emission bis hin zur Schmelztemperatur lässt sich gut durch den Wegfall der Löschung durch Ladungstransferprozesse aufgrund der Zerstörung der Duplexstruktur begründen.

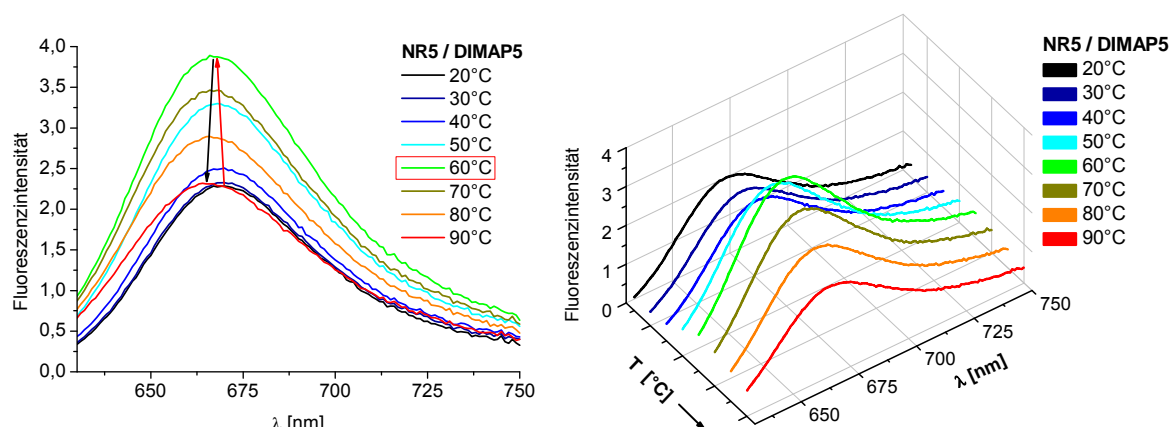


Abb. 121: Temperaturabhängige Emission des Ladungstransferduplexes **NR5/DIMAP5**

Zusammenfassend kann man sagen, dass der DNA-vermittelte Lochtransfer zwischen NRdU und DIMAPdU funktioniert. Dies ist dahingehend bemerkenswert, dass es bisher wenige Ladungstransfersysteme gibt, die bei einer derart großen Wellenlänge angeregt werden können wie das NRdU/DIMAPdU System. Limitiert wird die Anwendbarkeit allerdings durch die starke Störung der lokalen DNA-Struktur durch die beiden Modifikationen sowie die starke Distanzabhängigkeit der Ladungstransfereffizienz.

6.5.2 Elektronentransfer zwischen DIMAPdU und *N*-Phenylsulfonylindol

Indol dient als Bestandteil der natürlichen Aminosäure Tryptophan als Radikalfänger bei oxidativen Prozessen im Körper. Tryptophan besitzt mit $E_{\text{ox}}(\text{Trp}/\text{Trp}^{+\bullet}) = 1.0 \text{ V}^{[91, 372]}$ ein wesentlich geringeres Oxidationspotential als Guanin ($E_{\text{ox}}(\text{G}/\text{G}^{+\bullet}) = 1.3 \text{ V}^{[91]}$). Nach der Oxidation des Indols zum Radikalkation kommt es zu einer Deprotonierung am Stickstoff, wodurch ein ungeladenes Radikal entsteht. Die Lochakzeptor-

eigenschaften von Trp beim Ladungstransfer zwischen DNA und Peptiden wurden unter anderem von *Barton et al.* und *Wagenknecht et al.* untersucht.^[373-377] Außerdem wurden in der Arbeitsgruppe *Wagenknecht* verschiedene Indol-Basensurrogate synthetisiert^[228, 378] und die Lochakzeptoreigenschaften von Indol in Oligonukleotiden studiert.^[323, 379]

Im Rahmen dieser Arbeit sollte untersucht werden, ob sich substituierte Indole auch als Elektronenakzeptoren zur Untersuchung reduktiver EET-Prozesse in DNA eignen. Dazu wurde von *Effi Bätzner* im Rahmen ihrer Masterarbeit das *N*-Phenylsulfonyl-substituierte Indol-Basensurrogat (**In**) synthetisiert und in Oligonukleotide eingebaut.^[380]

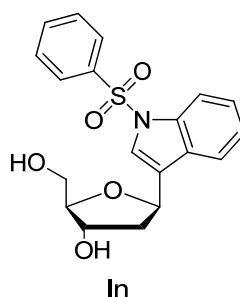


Abb. 122: Struktur des *N*-Phenylsulfonylindol-Nukleosids **In**

Barbaric konnte plausibel machen, dass es in einem Phenothiazin/*N*-Phenylsulfonylindol-System durch eine Elektronenübertragung vom Phenothiazin zum *N*-Phenylsulfonylindol zu einer reduktiven Abspaltung der Phenylsulfonyl-Gruppe kommt.^[379] Dies steht im Einklang mit Ergebnissen von *Padwa et al.*, die ebenfalls die Abspaltung von *N*-Phenylsulfonyl-Schutzgruppen von Indol infolge einer photoinduzierten Elektronentransferreaktion beobachteten.^[381] Dabei wird im ersten Schritt ein *N*-Phenylsulfonylindol-Radikalanion gebildet aus dem dann ein Phenylsulfonylradikal abgespalten wird.^[381] Demnach wäre *N*-Phenylsulfonylindol eine potentielle chemische Sonde für Ladungstransferprozesse, und der Ladungstransfer könnte anhand der Detektion der Folgeprodukte untersucht werden. Das Reduktionspotential für das verwendete *N*-Phenylsulfonylindol-Nukleosid (vgl. Abb. 122) wurde von *Barbaric* zu $E_{\text{red}}(\text{In}/\text{In}^{\cdot-}) = -1.9 \text{ V}$ bestimmt^[379] und liegt somit sogar etwas tiefer als die Potentiale der Pyrimidinbasen T und C. Demnach handelt es sich nicht um eine energetische, sondern um eine kinetische Ladungsfalle. Ziel dieser Arbeit war es anhand von Fluoreszenzmessungen den Elektronentransfer zwischen DIMAPdU und *N*-Phenylsulfonylindol zu erforschen.

Ladungstransferexperimente in DNA

Um den reduktiven Elektronentransfer zwischen DIMAPdU und dem *N*-Phenylsulfonylindol-Basensurrogat (**In**) in DNA zu untersuchen, wurden die mit DIMAPdU modifizierten Oligonukleotide **DIMAP1** – **DIMAP6**, und die komplementären mit *N*-Phenylsulfonylindol modifizierten Oligonukleotide **In1** – **In6** synthetisiert (vgl. Abb. 123). Die doppelt modifizierten Ladungstransferduplexe enthalten **In** im einen und DIMAPdU im anderen Oligonukleotid. Die Art (GC oder AT) und Anzahl (1 – 3) der dazwischen liegenden Basenpaare variiert von Duplex zu Duplex.

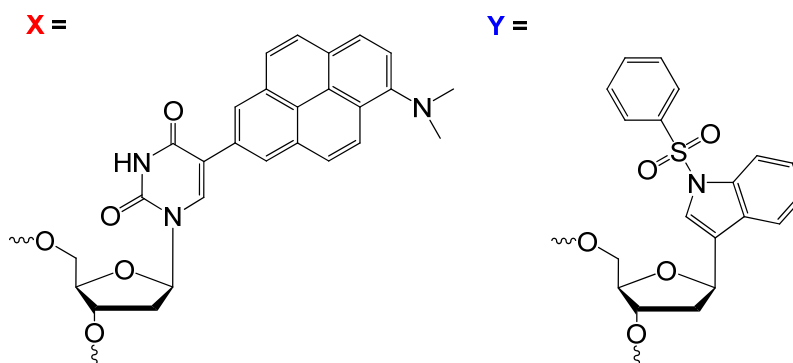
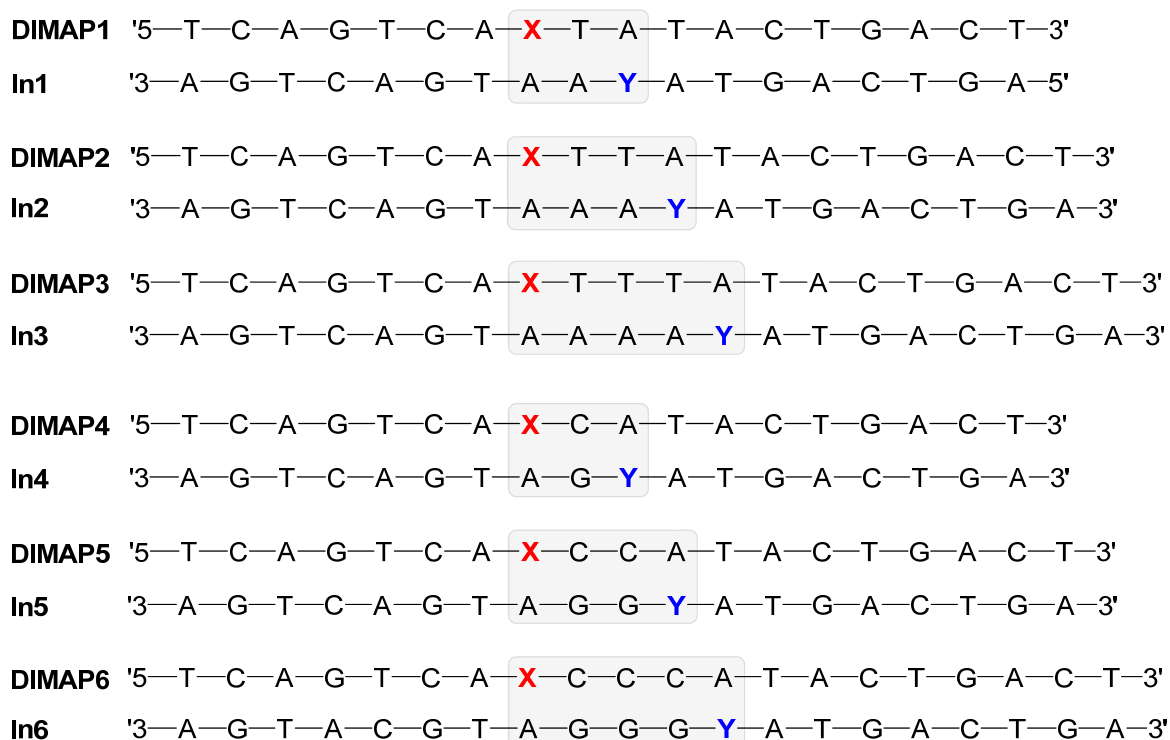


Abb. 123: Übersicht der Oligonukleotide zur Untersuchung des reduktiven Elektronentransfers von DIMAPdU auf **In**

Abb. 124 zeigt exemplarisch die Absorptionsspektren des EET-Duplexes **DIMAP2/In2**, sowie der entsprechenden einfach modifizierten Oligonukleotid-Duplexe **DIMAP2** und **In2**. Man erkennt, dass **In2** keine nennenswerte Absorption außerhalb des DNA-Bereichs zeigt und dass die Absorption von **DIMAP2/In2** bei Wellenlängen $\lambda > 300$ nm im Wesentlichen der Absorption von **DIMAP2** entspricht. DIMAPdU lässt sich demnach im Bereich $\lambda = 325$ nm – 400 nm in Gegenwart von **In** selektiv anregen.

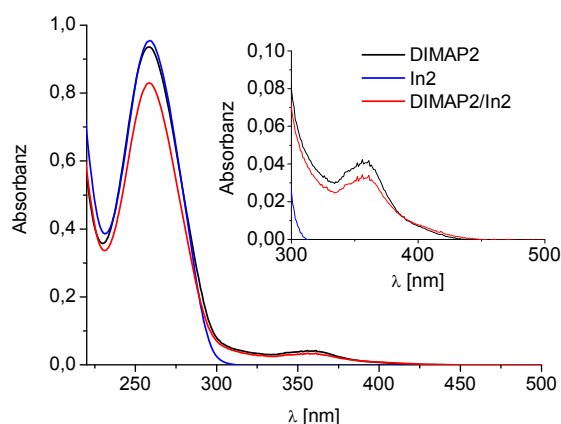


Abb. 124: : Absorptionsspektren der einfach modifizierten Oligonukleotid-Duplexe **DIMAP2** und **In2**, sowie des Ladungstransfer-Duplexes **DIMAP2/In2**.

Da die Fluoreszenzspektren der mit **In** modifizierten Oligonukleotide für die Untersuchung des Ladungstransfers nicht von Bedeutung sind, werden diese hier nicht näher erläutert. Die Emissionsspektren der mit DIMAPdU modifizierten Oligonukleotide **DIMAP1** – **DIMAP6** sind in Abb. 125 dargestellt.

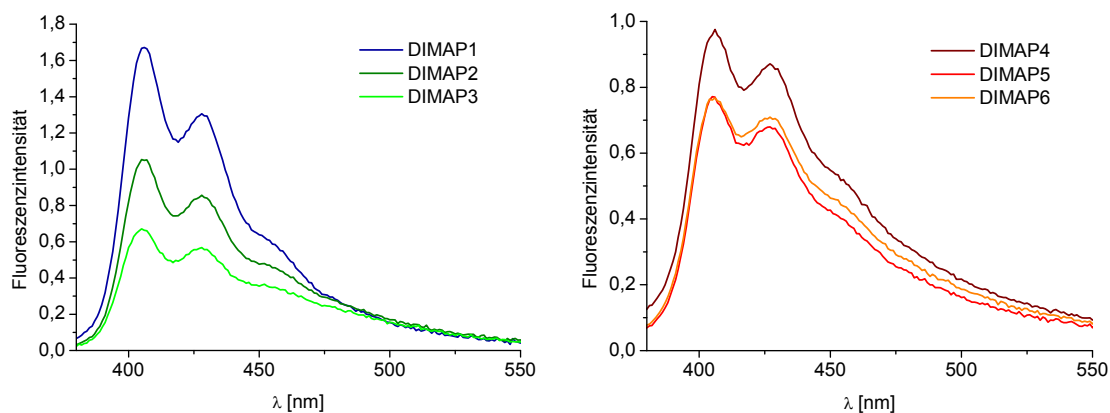


Abb. 125: Emissionsspektren der Oligonukleotid-Duplexe **DIMAP1** – **DIMAP3** (links) und **DIMAP4** – **DIMAP6** (rechts). ($\lambda_{\text{ex}} = 360$ nm)

Man erkennt deutlich, dass die Emission in den Duplexen **DIMAP1 – DIMAP3** mit steigender Anzahl an Thyminen in der Nachbarschaft zum DIMAPdU-Baustein abnimmt (Abb. 125 links). Eine Fluoreszenzlöschung von Pyren bzw. pyrenmodifizierten Uridinen durch benachbarte Thymine wurde bereits von *Kool et al.* und *Wanninger-Weiß* beobachtet.^[323, 358] Die Fluoreszenzlöschung lässt sich auf Elektronentransferprozesse zurückführen. In Duplexen **DIMAP4 – DIMAP6** (Abb. 125 rechts) ist keine eindeutige Abhängigkeit der Emissionsintensität von der Anzahl der benachbarten Pyrimidine zu erkennen.

Ein Vergleich der Emissionsintensitäten der mit DIMAPdU modifizierten Duplexe und der zusätzlich mit **In** modifizierten Elektronentransferduplexe ist in Abb. 126 dargestellt. Man erkennt, dass die Emission für die EET-Duplexe mit AT-Basenpaaren zwischen Elektronendonator und –akzeptor gegenüber den DIMAPdU-Duplexen nicht signifikant gelöscht wird (Abb. 126 links). Eine Distanzabhängigkeit der Löschung lässt sich aufgrund der geringen Fq-Werte (vgl. Tabelle 18) nicht bestimmen.

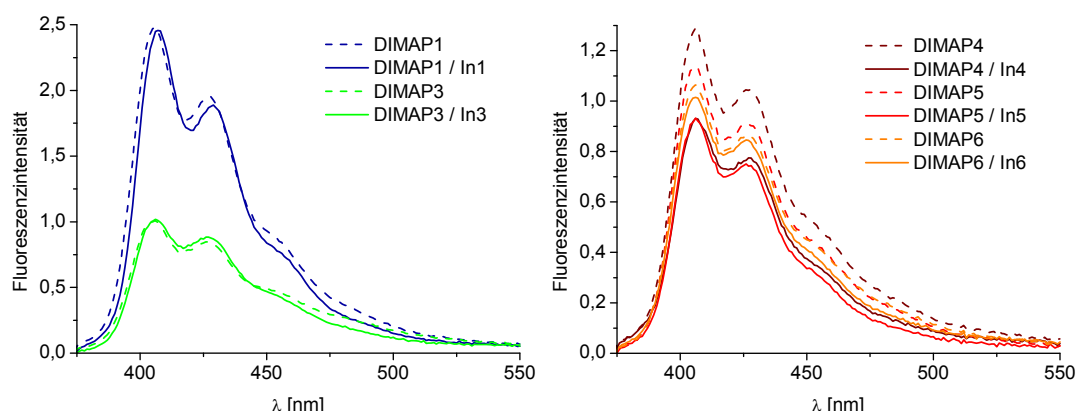


Abb. 126: Löschung der DIMAPdU Emission innerhalb der Ladungstransferduplexe mit AT (links) und GC (rechts) Basenpaaren zwischen DIMAPdU und **In**. ($\lambda_{\text{ex}} = 357 \text{ nm}$).

Für die EET-Duplexe mit GC-Basenpaaren zwischen Elektronendonator und –akzeptor lässt sich eine signifikante Verringerung der Fluoreszenz im Vergleich zu den nur mit DIMAPdU modifizierten Oligonukleotiden beobachten (Abb. 126 rechts). Die Fluoreszenzlöschung nimmt dabei erwartungsgemäß mit steigender Distanz zwischen DIMAPdU und **In** ab. Die entsprechenden Fq-Werte sind in Tabelle 18 wiedergegeben.

Tabelle 18: Fq-Werte für die Emissionslöschung der **DIMAP/In**-Duplexe. Als Referenz wurde jeweils die Emission der entsprechenden DIMAP-Oligonukleotide ohne Lochakzeptor verwendet.

Duplex	Fq [%]	Duplex	Fq [%]
DIMAP1 / In1	8	DIMAP4 / In4	30
DIMAP2 / In2	n.d.	DIMAP5 / In5	24
DIMAP3 / In3	8	DIMAP6 / In6	7

Offensichtlich spielt die Veränderung der Basensequenz zwischen DIMAPdU und **In** eine entscheidende Rolle bei der Migration der Ladung weg vom primär erzeugten $\text{DIMAP}^{++}\text{dU}^-$. Anhand statischer Fluoreszenzmessung lassen sich darüber allerdings keine fundierten Aussagen treffen. Die geringe Emissionslöschung ist nicht weiter verwunderlich, da es sich bei **In** um eine kinetische Ladungsfalle handelt und die Triebkraft des Elektronentransfers dadurch nicht weiter erhöht wird.

Um mehr über die Dynamik des EET zu erfahren, müssten zeitaufgelöste Emissionsspektren und transiente Absorptionen gemessen werden. Um den EET anhand der Abspaltung der Phenylsulfonyl-Gruppe nachzuweisen, müssten Bestrahlungsexperimente durchgeführt werden und die Produkte quantifiziert werden. Beides war allerdings nicht Bestandteil dieses Projekts und wird in der Arbeitsgruppe als gesondertes Projekt weitergeführt.

Um die Duplexstabilitäten zu untersuchen, wurden die Schmelztemperaturen für **DIMAP1 – DIMAP6**, **In1 – In6** und **DIMAP1/In1 – DIMAP6/In6** bestimmt (Tabelle 19). Man erkennt, dass sowohl DIMAPdU, als auch **In** die Oligonukleotid-Duplexe destabilisieren. Interessanterweise zeigt sich für die HT-Duplexe (**DIMAP1/In1 – DIMAP3/In3** und **DIMAP4/In4 – DIMAP6/In6**) keine Erhöhung der T_m -Werte mit steigender Anzahl an Basenpaaren zwischen **In** und DIMAPdU.

Tabelle 19: Schmelztemperaturen der Duplexe **DIMAP1 – 6**, **In1 – 6** und **DIMAP1/In1 – DIMAP6/In6**; die ΔT_m -Werte beziehen sich jeweils auf unmodifizierte, vollständig komplementäre Duplexe, die T anstelle der Modifikationen enthalten;

Duplex	T_m [°C]	ΔT_m [°C]	Duplex	T_m [°C]	ΔT_m [°C]
DIMAP1	56.8	-2.8	DIMAP4	57.8	-4.9
DIMAP2	56.8	-4.2	DIMAP5	60.2	-5.4
DIMAP3	56.6	-4.8	DIMAP6	62.7	-5.2

In1	51.5	-8.2	In4	54.8	-7.9
In2	52.4	-8.6	In5	68.3	-7.4
In3	53.8	-7.7	In6	61.7	-6.2
DIMAP1 / In1	59.8	-0.1	DIMAP4 / In4	58.3	-4.4
DIMAP2 / In2	58.9	-2.1	DIMAP5 / In5	56.2	-9.5
DIMAP3 / In3	57.1	-4.3	DIMAP6 / In6	56.8	-11.1

6.5.3 Ladungstransferexperimente zwischen DIMAPdU und DAP²⁺

In einem dritten Ladungstransfersystem sollte ein 2,7-Dimethyldiazapyrenium-Analogon (DAP²⁺) als Elektronenakzeptor verwendet werden. Der Elektronenakzeptor wurde aus mehreren Gründen gewählt:

- DAP²⁺ interkaliert in doppelsträngige Oligonukleotide^[382] und ist somit elektronisch optimal mit dem Basenstapel gekoppelt.
- DAP²⁺ besitzt sehr niedrige Reduktionspotentiale.^[383]
- Die Reduktion zum DAP^{•+} ist unter aeroben Bedingungen in wässrigen Lösungen reversibel.^[384]
- Das bei der Reduktion entstehende DAP^{•+} ist relativ langlebig und kann spektroskopisch detektiert werden.^[144]
- Der Elektronenrücktransfer wird durch das den Verbleib einer positiven Ladung am DAP^{•+} minimiert.
- Photoangeregtes DAP²⁺ kann als Lochdonor fungieren und DIMAPdU oxidieren. Ein Ladungstransfer wäre somit in beide Richtungen möglich.

DAP²⁺ zeigt in wässriger Lösung eine starke Fluoreszenz mit einer Quantenausbeute von $\Phi_F = 0.63$ und einer Fluoreszenzlebenszeit von $\tau_F = 9.0 \text{ ns}$.^[384] Die Emission wird durch Interkalation in Oligonukleotide stark gelöscht.^[385] Grund hierfür ist eine photoinduzierte Oxidation der Nukleobasen durch den Chromophor. *Burn et al.* konnten durch Laser-Puls-Photolyse-Experimente zeigen, dass quaternäre

diazaaromatische Farbstoffe bei Bestrahlung mit sichtbarem Licht in der Lage sind, Nukleobasen und Oligonukleotide reversibel zu oxidieren.^[384] Ikeda *et al.* waren die ersten, die ein Dialkyldiazapyrenium-Dikation (DAP^{2+}) kovalent an Oligonukleotide knüpften. Sie konnten zeigen, dass DAP^{2+} nach Photoanregung in der Lage ist, Oligonukleotide zu spalten.^[386, 387] Brun *et al.* konnten zeigen, dass ein photoinduzierter Elektronentransfer zwischen den beiden Interkalatoren Ethidium und DAP^{2+} in DNA stattfindet. Sie konnten dabei auch das DAP^{*+} -Monokation als Ladungstransferprodukt nachweisen.^[144] Allerdings waren weder Ethidium noch DAP^{2+} kovalent an die Oligonukleotide gebunden, wodurch der Ort der Interkalation nicht bestimmt werden kann.

Betrachtet man das Reduktionspotential von DAP^{2+} ($E_{\text{red}1} = -0.26 \text{ V}$) und das Oxidationspotential von DIMAPdU im angeregten Zustand ($E_{\text{ox}}^* = -2.19 \text{ V}$), so ergibt sich eine Triebkraft $\Delta G = -1.93 \text{ eV}$ für den reduktiven Elektronentransferprozess von photoangeregtem DIMAP^{*}dU auf DAP^{2+} . Die Triebkraft für den Lochtransfer von photoangeregtem DAP^{2+*} auf DIMAPdU berechnet sich unter Verwendung des Oxidationspotentials für DIMAPdU im Grundzustand ($E_{\text{ox}} = 0.88 \text{ V}$) und des genäherten Reduktionspotentials von DAP^{2+} im angeregten Zustand ($E_{00} \sim 2.95 \text{ eV}$; $E_{\text{red}1}^* = -2.69 \text{ V}$) zu $\Delta G = -1.81 \text{ eV}$.

Aufbauend auf diese Ergebnisse war das Ziel dieses Projekts, ein Ladungstransfersystem zu entwickeln, in dem sowohl die Injektion des Elektrons in den Basenstapel anhand der DIMAPdU-Emissionslöschung, als auch das Ankommen des Elektrons am Akzeptor durch die charakteristische Absorption von DAP^{*+} direkt spektroskopisch verfolgt werden können.

Ladungstransferexperimente in DNA

Die für die Ladungstransferexperimente verwendeten Oligonukleotide sind in Abb. 127 dargestellt. Die DAP^{2+} -modifizierten Oligonukleotide wurden von Christian Wellner im Rahmen seiner Masterarbeit im Arbeitskreis Wagenknecht synthetisiert und charakterisiert.^[388]

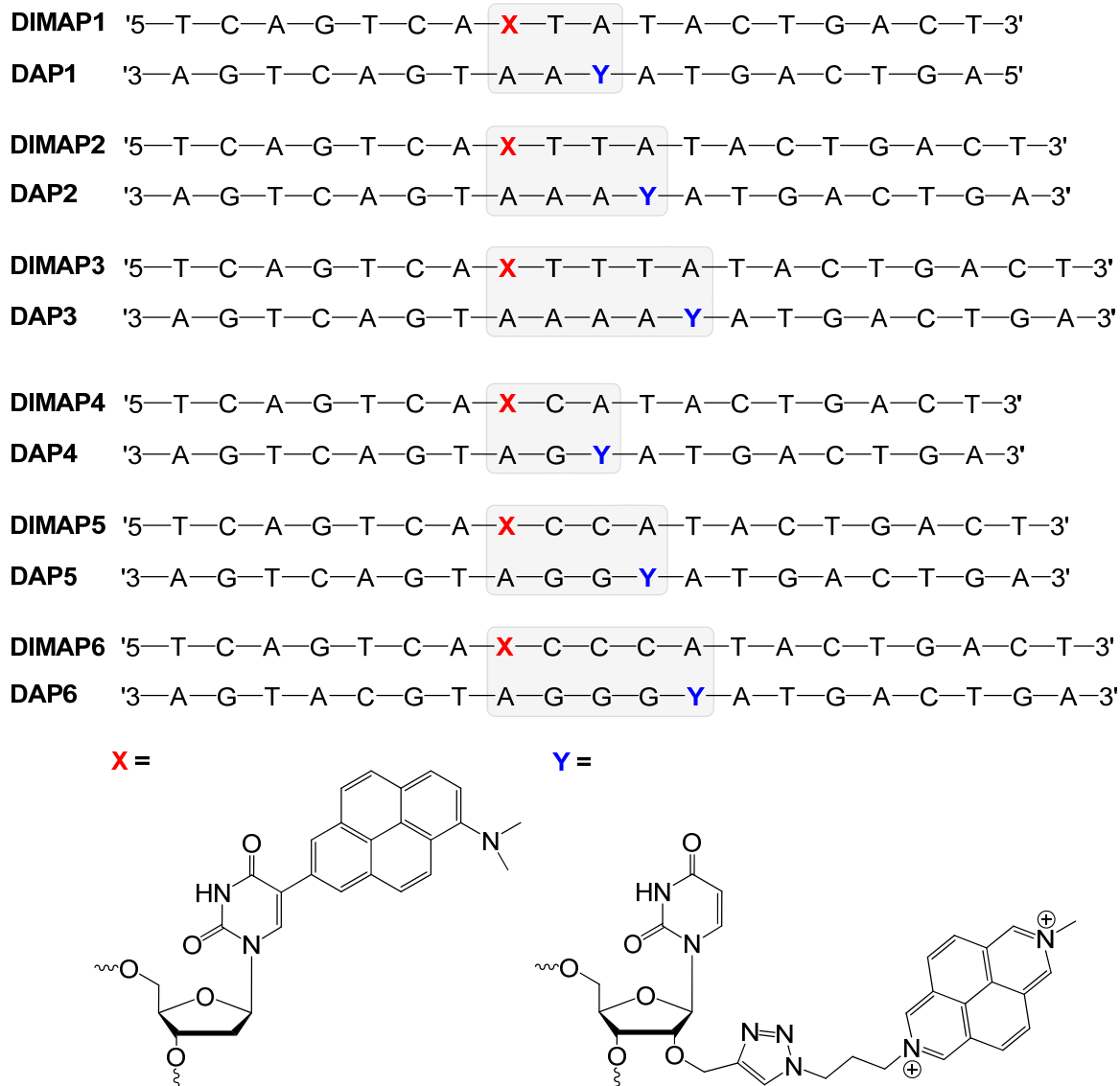


Abb. 127: Übersicht der Oligonukleotide zur Untersuchung des Ladungstransfers zwischen DIMAPdU und DAP²⁺.

Die im Folgenden dargestellten Messungen wurden alle an doppelsträngigen Oligonukleotiden durchgeführt. Soweit kein Gegenstrang angegeben ist, wurden vollständig komplementäre Gegenstränge mit A als Gegenbase zur Modifikation verwendet.

Die Absorptionsspektren der DIMAP-Duplexe wurden in den vorherigen Kapiteln bereits gezeigt und werden deshalb hier nicht mehr erläutert. In den Absorptionsspektren für die DAP-Duplexe erkennt man zwei Banden außerhalb des DNA-Bereichs (vgl. Abb. 128). Die erste liegt im Wellenlängenbereich $\lambda = 310 \text{ nm} - 350 \text{ nm}$ mit einem Maximum bei $\lambda = 339 \text{ nm}$. Es handelt sich dabei,

ähnlich wie bei Pyren, um den erlaubten $S_0 - S_2$ -Übergang. Die bathochrom verschobene schwächere Bande zwischen $\lambda = 375 \text{ nm} - 450 \text{ nm}$ mit einem Maximum bei $\lambda = 424 \text{ nm}$ kann dem im Pyren verbotenen $S_0 - S_1$ -Übergang zugeordnet werden.^[385] Es fällt auf, dass in etwa bei der Wellenlänge der maximalen DIMAPdU-Absorption ($\lambda_{\text{max}} = 357 \text{ nm}$) die DAP^{2+} -Absorption annähernd gleich null ist. Das bedeutet, dass es möglich sein sollte, DIMAPdU in diesem Bereich auch in Gegenwart von DAP^{2+} relativ selektiv anzuregen. In Abb. 128 sind exemplarisch die Absorptionsspektren für **DIMAP2**, **DAP2** und **DIMAP2/DAP2** gezeigt.

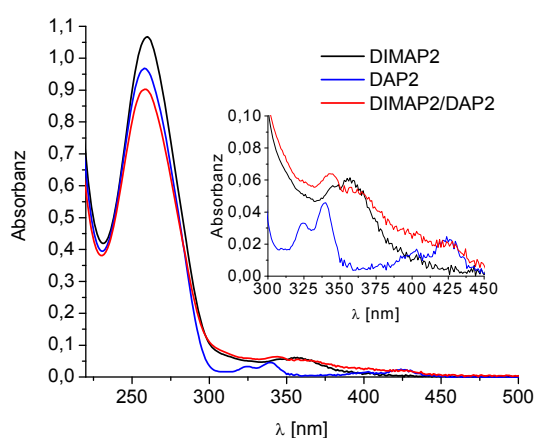


Abb. 128: Absorptionsspektren der einfach modifizierten Oligonukleotid-Duplexe **DIMAP2** und **DAP2**, sowie des Ladungstransfer-Duplexes **DIMAP2/DAP2**.

Um den Ladungstransfer zwischen DIMAPdU und DAP^{2+} zu untersuchen, wurden die Emissionen der Duplexe **DIMAP1 – 6**, **DAP1 – 6** und **DIMAP1/DAP1 – DIMAP6/DAP6** gemessen. Alle Oligonukleotide wurden einmal bei $\lambda_{\text{ex}} = 360 \text{ nm}$ und einmal bei $\lambda_{\text{ex}} = 339 \text{ nm}$ angeregt. Dabei war leider keine selektive Anregung von DIMAPdU bei 360 nm möglich, da aufgrund der geringen Quantenausbeute von DIMAPdU große Spaltbreiten für die Anregung verwendet werden mussten, um eine ausreichende Emission zu erhalten.

Im Folgenden werden zunächst die Emissionsspektren der Duplexe mit AT-Basenpaaren zwischen Ladungsdonor und Akzeptor gezeigt und diskutiert. Die Spektren der Duplexe **DIMAP1 – 6** entsprechen den im vorherigen Kapitel erläuterten.

Die DAP-Duplexe (**DAP1 – 3**) zeigen eine strukturierte Emissionsbande im Wellenlängenbereich $\lambda = 410 \text{ nm} - 500 \text{ nm}$ mit einem Maximum bei $\lambda = 425 \text{ nm}$ und

zwei Schultern bei $\lambda = 450$ nm und 477 nm (Abb. 129 rechts oben). Zusätzlich tritt eine unstrukturierte Emission im Bereich zwischen $\lambda = 500$ nm und 600 nm auf. Interessanterweise tritt diese langwellige Emission nur bei einer Anregung bei $\lambda = 360$ nm (Abb. 129 rechts oben), nicht jedoch bei einer Anregungswellenlänge von $\lambda = 339$ nm auf (Abb. 129 rechts unten). Wodurch diese langwellige Bande zustande kommt, konnte nicht geklärt werden. Aus der Literatur ist bekannt, dass durch Anregung bei $\lambda = 355$ nm ein nicht zu vernachlässigender Anteil der Moleküle in den Triplett-Zustand übergeht.^[384] Möglicherweise kommt es zu einer Emission aus dem Triplett-Zustand.

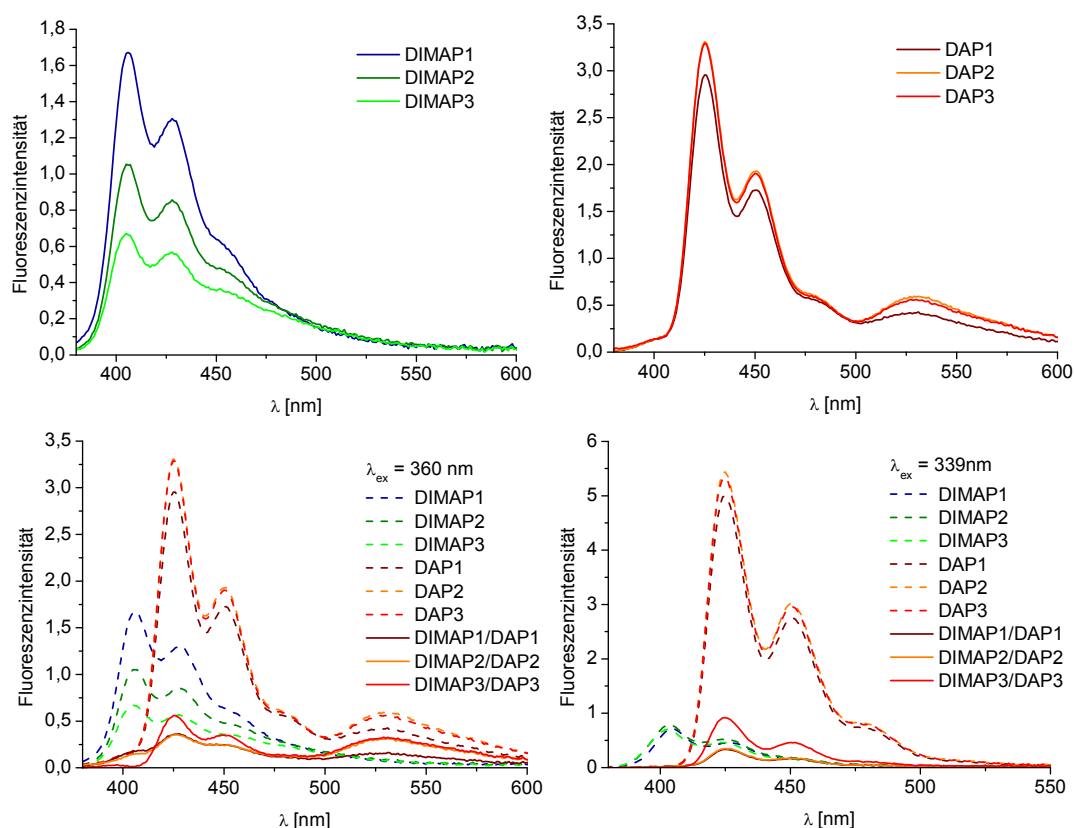


Abb. 129: Emissionsspektren der einfach modifizierten Oligonukleotide **DIMAP 1 – 3** und **DAP 1 – 3**, sowie der Ladungstransferduplexe **DIMAP1/DAP1 – DIMAP3/DAP3** bei einer Anregungswellenlänge von 360 nm (oben und unten links) und 339 nm (unten rechts).

Beim Vergleich der Emission der doppelt modifizierten Ladungstransferduplexe (**DIMAP1/DAP1 – DIMAP3/DAP3**) mit den einfach modifizierten DIMAP- bzw. DAP-Duplexen fällt auf, dass die DIMAP-Fluoreszenz ($\lambda_{\text{max}} = 407$ nm) in allen Fällen komplett gelöscht und die DAP^{2+} -Fluoreszenz stark verringert ist (Abb. 129 unten).

Bemerkenswert ist die geringe Distanzabhängigkeit der Emissionslöschung. Die DIMAPdU-Fluoreszenz wird selbst bei drei Basenpaaren zwischen Elektronendonator und –akzeptor noch vollständig gelöscht. Dies lässt sich wahrscheinlich auf die große Triebkraft des EET ($\Delta G_{\text{EET}} = -1.93 \text{ eV}$) zurückführen. Auch der oxidative HT funktioniert über eine Distanz von drei Basenpaaren noch sehr effizient. Die zugehörigen Fq-Werte sind in Tabelle 20 wiedergegeben. Die unterschiedlichen Fq-Werte für eine Anregung bei $\lambda = 360 \text{ nm}$ und $\lambda = 339 \text{ nm}$ kommen im Wesentlichen durch den Beitrag der langwelligen Emissionsbande zustande.

Zusätzlich zu den Emissionsmessungen bei 20°C wurde auch die Temperaturabhängigkeit der Fluoreszenz untersucht. Wie zu erwarten, sind die Emissionsintensitäten der einfach modifizierten Oligonukleotid-Duplexe **DIMAP1** und **DAP1** bei höheren Temperaturen verringert. Die entsprechenden Spektren sind in Abb. 130 dargestellt.

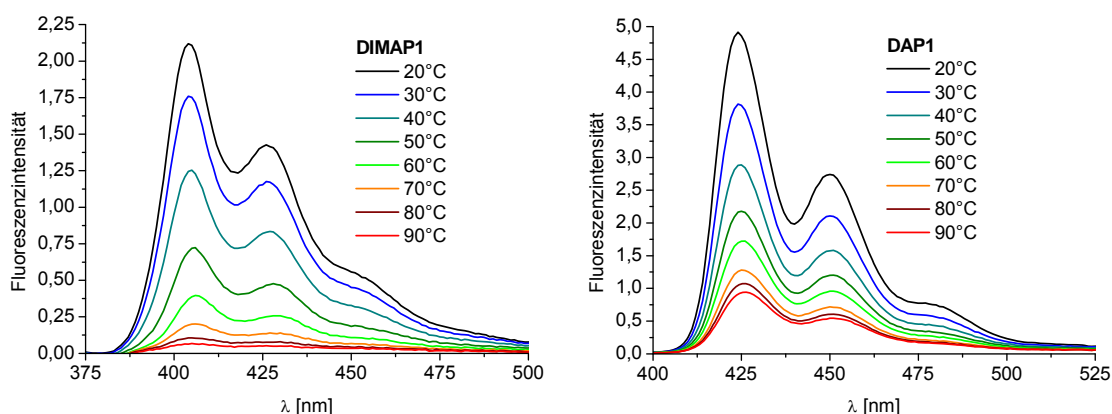


Abb. 130: Emissionsspektren der einfach modifizierten Oligonukleotide **DIMAP1** (links; $c = 10 \mu\text{M}$) und **DAP 1** (rechts; $c = 2.5 \mu\text{M}$) bei unterschiedlichen Temperaturen ($\lambda_{\text{ex}} = 339 \text{ nm}$).

Für die Ladungstransfer-Duplexe ergibt sich eine andere Temperaturabhängigkeit der Emission. Zwar wird auch hier die Emission bei steigender Temperatur verringert, allerdings wird dieser Effekt durch den Wegfall des Ladungstransfers bei der Dehybridisierung der Duplexe mehr als kompensiert. Es kommt also zunächst zu einem Emissionsanstieg durch Wegfall der Ladungstransferkomponente und erst oberhalb der Schmelztemperatur zu einem temperaturbedingten Absinken der Fluoreszenz. Leider kann dieses Verhalten aufgrund der überlagerten Emissionen von DIMAPdU und DAP^{2+} und der sehr geringen Emissionsintensitäten von

DIMAPdU nur für die DAP^{2+} -Emission deutlich beobachtet werden. Abb. 131 zeigt die entsprechenden Spektren für **DIMAP1/DAP1**.

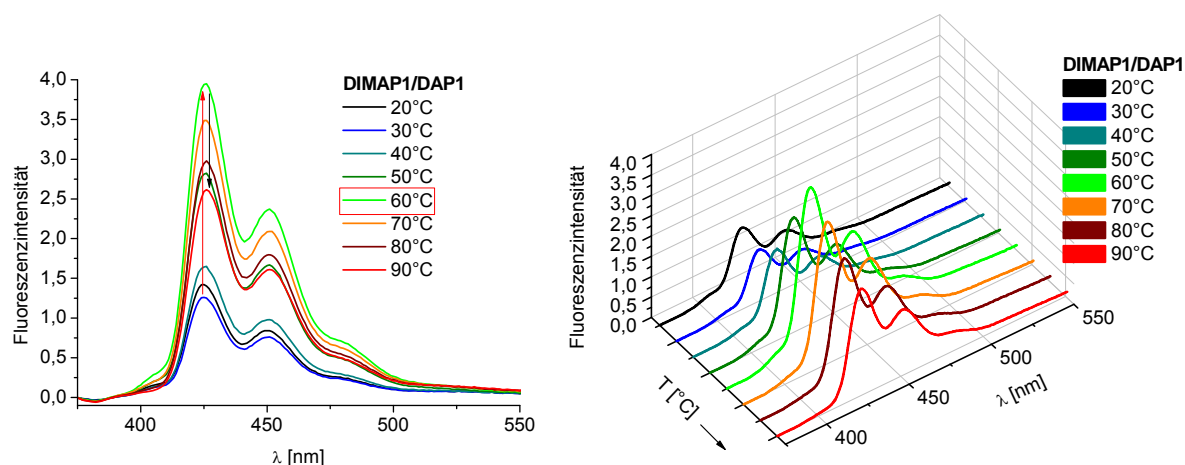


Abb. 131: Emissionsspektren des Ladungstransfer-Duplexes **DIMAP1/DAP1** ($c = 10 \mu\text{M}$) bei unterschiedlichen Temperaturen ($\lambda_{\text{ex}} = 339 \text{ nm}$).

Die Emissionsspektren der Duplexe mit GC-Basenpaaren zwischen Donor und Akzeptor unterscheiden sich doch deutlich von denen der AT-Duplexe. Die Fluoreszenz der DAP-Oligonukleotide (**DAP4 - 6**) ist gegenüber **DAP1 - 3** deutlich verringert (Abb. 132 rechts oben). Die Emissionslöschung steigt mit der Anzahl der benachbarten Guanine. Dies ist nicht weiter verwunderlich, da DAP^{2+} in der Lage ist, Nukleobasen zu oxidieren, insbesondere weil G die Base mit dem geringsten Oxidationspotential ist. Außerdem sinkt das Oxidationspotential für mehrere benachbarte Guanine noch weiter ab.^[119, 389] Die Emissionsverringering lässt sich also der verstärkten Oxidation von Guanin zuschreiben. Interessanterweise wird die langwellige Emissionsbande kaum durch die Anzahl der benachbarten Guanine beeinflusst.

Bei Betrachtung der Emission der Ladungstransfer-Duplexe und der einfach modifizierten Oligonukleotide **DAP4 - 6** und **DIMAP4 - 6** zeigt sich erneut eine nahezu quantitative Löschung der DIMAP-Emission und eine Reduzierung der DAP^{2+} -Fluoreszenz (Abb. 132 unten). Auffällig ist dabei, dass alle drei Ladungstransferduplexe bei einer Anregung bei $\lambda = 360 \text{ nm}$ annähernd die gleiche Restfluoreszenz aufweisen (Abb. 132 links unten), die auch der Emission von **DAP6** entspricht. Die **DAP6**-Emission wird demnach auch durch Anwesenheit des Lochakzeptors (**DIMAP6/DAP6**) nicht weiter verringert. Dies ist im erstem Moment

überraschend, da die Triebkraft ΔG des Ladungstransfers für DIMAPdU ($E_{ox} = 0.88$ V) als Akzeptor im Vergleich zu GGG ($E_{ox} \sim 1.2$ V^[91, 119]) als Lochakzeptor signifikant größer ist. Die Geschwindigkeit der Ladungsinjektion scheint demnach ab einem gewissen ΔG unabhängig von der Triebkraft zu sein. Wie bereits in Abschnitt 3.3.2 erläutert, haben diverse Faktoren Einfluss auf die Ladungstransferrate und -effizienz. Darüber, was letztendlich der geschwindigkeitsbestimmende Faktor ist, kann anhand der gemachten statischen Fluoreszenzmessungen keine Aussage getroffen werden.

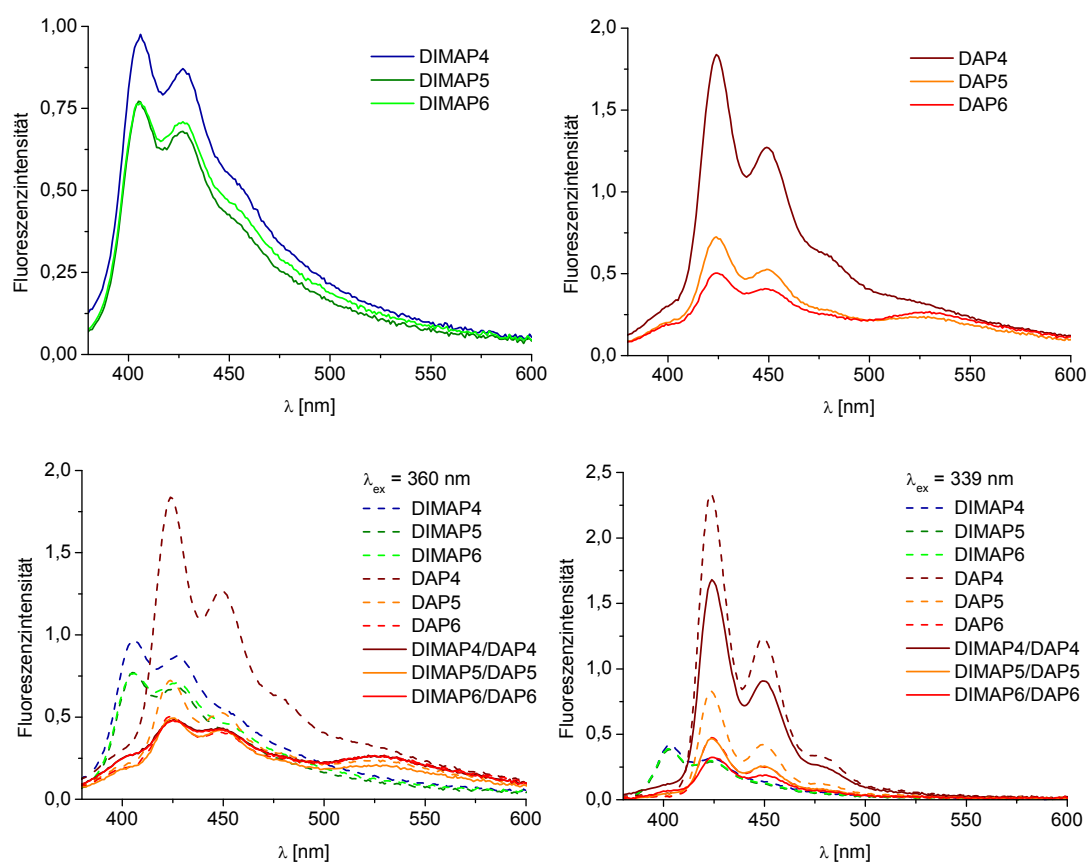


Abb. 132: Emissionsspektren der einfach modifizierten Oligonukleotide **DIMAP 4 – 6** und **DAP 4 – 6**, sowie der Ladungstransfer-Duplexe **DIMAP4/DAP4 – DIMAP4/DAP6** bei einer Anregungswellenlänge von 360 nm (oben und unten links) und 339 nm (unten rechts).

Im Falle einer Anregung bei $\lambda = 339$ nm sind die Emissionsintensitäten von **DIMAP4/DAP4**, **DIMAP5/DAP5** und **DIMAP6/DAP6** deutlich verschieden (Abb. 132 unten rechts). Wodurch das unterschiedliche Verhalten je nach Anregungswellenlänge ausgelöst wird, ist nicht bekannt. Die entsprechenden Fq-Werte für die unterschiedlichen Anregungswellenlängen sind in Tabelle 20 zusammengestellt.

Tabelle 20: Fluoreszenzlöschung innerhalb der Ladungstransfer-Duplexe **DIMAP1/DAP1** – **DIMAP6/DAP6** bei unterschiedlichen Anregungswellenlängen.

Duplex	Fq [%]	Fq [%] (DAP ²⁺)	Fq [%] (DAP ²⁺)
	(DIMAPdU)	$\lambda_{\text{ex}} = 339 \text{ nm}$	$\lambda_{\text{ex}} = 360 \text{ nm}$
DIMAP1 / DAP1	100	92	77
DIMAP2 / DAP2	100	92	74
DIMAP3 / DAP3	100	83	71
DIMAP4 / DAP4	100	22	50
DIMAP5 / DAP5	100	27	19
DIMAP6 / DAP6	100	---	---

Die Duplexe mit GC-Basenpaaren zwischen Donor und Akzeptor zeigen in allen Fällen geringere Fq-Werte für die DAP²⁺-Emission als die analogen AT-Duplexe. Der Grund dafür liegt in der bereits ohne Lochakzeptor stark gelöschten DAP²⁺-Emission der Referenz-Oligonukleotide **DAP4 – 6**.

Die Ladungstransferexperimente haben gezeigt, dass der reduktive Elektronentransfer von DIMAPdU* auf DAP²⁺ in allen untersuchten Systemen zu einer quantitativen Löschung der DIMAP-Emission führt. Für den EET lässt sich demnach keine Aussage über den Einfluss unterschiedlicher Basensequenzen zwischen DIMAPdU und DAP²⁺ machen. Es kann auch nicht abgeschätzt werden, über welche Distanz der EET effizient funktioniert. Dies wird, ebenso wie die Ermittlung der Elektronentransferraten Teil eines weiterführenden Projektes innerhalb unserer Arbeitsgruppe sein.

Die Emissionslöschung durch oxidativen Lochtransfer zwischen DAP^{2+*} und DIMAPdU zeigt für AT-Basenpaare zwischen Donor und Akzeptor eine geringe Distanzabhängigkeit. Die erreichten Fq-Werte liegen im Bereich von 71 – 77% ($\lambda_{\text{ex}} = 360 \text{ nm}$). Der Einfluss der Anregungswellenlänge ist gering. Für GC-Basenpaare zwischen Donor und Akzeptor wird die DAP²⁺-Emission bereits durch die Anwesenheit von benachbarten Guaninen gelöscht. In Anwesenheit von DIMAPdU als Lochakzeptor wird die Emission weiter verringert. Die Anregungswellenlänge hat

einen deutlichen Einfluss auf die Fq-Werte der DAP²⁺-Emission. Eine Erklärung für dieses Verhalten konnte in Rahmen dieser Arbeit nicht gefunden werden.

Um die Duplexstabilitäten genauer zu untersuchen, wurden die Schmelztemperaturen für **DIMAP1 – DIMAP6**, **DAP1 – DAP6** und **DIMAP1/DAP1 – DIMAP6/DAP6** bestimmt (Tabelle 19). Man erkennt, dass DAP²⁺ die Oligonukleotid-Duplexe stabilisiert.

Tabelle 21: Schmelztemperaturen der Duplexe **DIMAP1 – 6**, **DAP1 – 6** und **DIMAP1/DAP1 – DIMAP6/DAP6**; die ΔT_m -Werte beziehen sich jeweils auf unmodifizierte, vollständig komplementäre Duplexe, die T anstelle der Modifikationen enthalten;

Duplex	T_m [°C]	ΔT_m [°C]	Duplex	T_m [°C]	ΔT_m [°C]
DIMAP1	56.8	-2.8	DIMAP4	57.8	-4.9
DIMAP2	56.8	-4.2	DIMAP5	60.2	-5.4
DIMAP3	56.6	-4.8	DIMAP6	62.7	-5.2
DAP1	59.5	-0.1	DAP4	64.1	+1.4
DAP2	60.3	-0.7	DAP5	68.7	+3.1
DAP3	61.6	+0.2	DAP6	69.7	+1.8
DIMAP1 / DAP1	54.3	-5.3	DIMAP4 / DAP4	57.7	-5.0
DIMAP2 / DAP2	55.1	-5.9	DIMAP5 / DAP5	59.7	-5.9
DIMAP3 / DAP3	60.5	-0.9	DIMAP6 / DAP6	65.3	-2.6

6.6 Zusammenfassung der Ergebnisse

Der nukleosidische Elektronendonator DIMAPdU konnte in fünf Stufen synthetisiert werden. Die Schlüsselschritte der Synthese sind die iridiumkatalysierte regioselektive Borylierung von 1-(N,N-Dimethylamino)-pyren und die anschließende Suzuki-Kreuzkupplung mit 5-Iodo-2'-deoxyuridin.

Der DIMAPdU-Nukleosidbaustein wurde spektroskopisch und elektrochemisch charakterisiert. Dabei wurde eine nahezu quantitative Emissionslöschung im Vergleich zu DIMAP festgestellt. Diese konnte anhand transienter Absorptionsmessungen durch die rasche Ausbildung eines nicht-emittierenden

ladungsgetrennten $\text{DIMAP}^{++}\text{dU}^{--}$ -Zustands erklärt werden. Die Redoxpotentiale von DIMAPdU im angeregten Zustand unterstützen diese Interpretation. Die bei der Oxidation und Reduktion von DIMAP und DIMAPdU entstehenden Radikale wurden spektroskopisch charakterisiert. Die erhaltenen Spektren für die Reduktion von DIMAPdU sind denen für 2PydU sehr ähnlich, was für eine geringe elektronische Kopplung zwischen DIMAP und dU spricht. Anhand der ermittelten Redoxpotentiale im angeregten Zustand kann davon ausgegangen werden, dass photoangeregtes DIMAPdU in der Lage ist, T und C zu reduzieren, nicht jedoch G oder A zu oxidieren. Im Gegensatz zu 1PydU und 2PydU handelt es sich um einen reinen Elektronendonator bzw. Lochakzeptor.

DIMAPdU konnte mittels automatisierter Festphasensynthese in Oligonukleotide eingebaut werden. In DNA zeigt DIMAPdU, im Gegensatz zu 1PydU, eine strukturierte pyrenartige Emission, was wiederum für eine geringe elektronische Kopplung zwischen Chromophor und dU spricht. Die schwache Fluoreszenz des DIMAPdU-Nukleosidbausteins wird in Oligonukleotiden durch Elektronentransfer auf die Pyrimidinbasen weiter verringert. Die Elektroneninjektion in den DNA-Basenstapel konnte anhand transientser Absorptionsmessungen zeitlich verfolgt werden.

Es konnte gezeigt werden, dass der DNA-vermittelte oxidative Lochtransfer von photoangeregtem NRdU auf DIMAPdU im Grundzustand funktioniert. DIMAPdU lässt sich also als Lochakzeptor bei der Untersuchung des HT einsetzen. Das bemerkenswerte am NRdU/DIMAPdU-System ist die große Wellenlänge der Anregung und der Emission. In einem zweiten Ladungstransfersystem wurde der DNA-vermittelte Elektronentransfer von photoangeregtem DIMAPdU auf *N*-Phenylsulfonylindol als Elektronenakzeptor untersucht. Anhand der Fluoreszenzmessungen konnte gezeigt werden, dass der EET stark von der Basensequenz zwischen Elektronendonator und -akzeptor abhängt. Beim dritten untersuchten Ladungstransfersystem, dem DIMAPdU/ DAP^{2+} -System, handelt es sich um ein binäres System, an dem sich sowohl der oxidative Lochtransfer als auch der reduktive Elektronentransfer untersuchen lassen. Beim HT dient angeregtes DAP^{2+} als Lochdonor und DIMAPdU als Lochakzeptor. Beim EET werden Elektronen vom angeregten DIMAPdU auf DAP^{2+} übertragen. Es konnte gezeigt werden, dass beide Prozesse funktionieren. Der EET läuft unabhängig von der Art und Anzahl (1-3) der

Basenpaare zwischen DIMAPdU und DAP^{2+} mit sehr großer Effizienz ab. Man erhält in allen Fällen eine nahezu quantitative Löschung der DIMAPdU-Emission. Dies ist bemerkenswert, da Ladungstransferprozesse in kovalent an DNA geknüpften Donor-Akzeptor-Systemen normalerweise eine sehr steile Distanzabhängigkeit aufweisen und bereits über drei Basenpaare nur noch mit sehr geringer Effizienz ablaufen.^[116] Für den HT zeigt sich im DIMAPdU/ DAP^{2+} System eine deutliche Abhängigkeit der Effizienz von der Art der Basenpaare zwischen dem angeregten Lochdonor DAP^{2+} und dem Lochakzeptor DIMAPdU. In den Ladungstransferduplexen mit AT-Basenpaaren läuft der HT deutlich effizienter ab als bei den entsprechenden Duplexen mit GC-Basenpaaren zwischen Donor und Akzeptor. Die Distanzabhängigkeit des HT über AT-Basenpaare ist gering, so dass die Fluoreszenzlöschung auch über drei Basenpaare nur leicht verringert ist. Über die Distanzabhängigkeit des HT über GC-Basenpaare lässt sich aufgrund der durch Guanine gelöschten DAP^{2+} -Emission keine verlässliche Aussage machen.

7 Metallkomplex vermittelte Ladungstransferreaktionen

Um funktionelle Nanosysteme auf molekularer Ebene aufzubauen, ist eine präzise und kontrollierte Anordnung der Atome und Moleküle in drei Dimensionen entscheidend. Das sich DNA eignet, um programmierbar Komplexe Netzwerke aufzubauen, wurde in der Zwischenzeit von diversen Gruppen gezeigt.^[247, 390] Ebenso konnte durch *Shionoya et al.* und *Carell et al.* gezeigt werden, dass es möglich ist, Metallionen positionskontrolliert in Oligonukleotide einzubringen und mittels ESR elektronische Kopplungen zwischen den d-Elektronen von Cu^{II}-Zentralatomen in benachbarten metallionenvermittelten Basenpaaren zu messen.^[258, 259] Allerdings wurde bisher noch von keiner Gruppe untersucht, ob sich die kontrollierte Anordnung von Metallkomplexen und Metallionen zum Aufbau molekularer Leiter auf DNA-Basis verwendet lässt und sich so möglicherweise Nanodrähte mit kontrollierbaren Leitfähigkeiten herstellen lassen.

In den vorherigen Abschnitten konnte bereits gezeigt werden, dass sich mit HQ-Ligandosiden sehr stabile Cu²⁺-vermittelte Basenpaare ausbilden und dass sowohl der reduktive Elektronentransfer von photoangeregtem DIMAPdU* auf DAP²⁺, als auch der oxidative Lochtransfer von photoangeregtem DAP^{2+*} auf DIMAPdU mit natürlichen Basenpaaren zwischen Ladungsdonor und –akzeptor funktioniert. Aufbauend auf diese Ergebnisse sollte die Möglichkeit eines Ladungstransfers über metallionenvermittelte HQ-Basenpaare untersucht werden. Dabei stand nicht die Ermittlung von Ladungstransferraten oder –ausbeuten im Vordergrund, sondern lediglich die Frage ob Ladungstransferprozesse über metallionenvermittelte Basenpaare ablaufen oder nicht.

Für die Untersuchungen zum Ladungstransfer über hydroxychinolinvermittelte Basenpaare wurden die gleichen Oligonukleotidsequenzen wie für die Studien zum Ladungstransfer über natürliche Basenpaare verwendet. Der einzige Unterschied besteht im Bereich zwischen Ladungsdonor und Ladungsakzeptor. Dort wurden die natürlichen Basenpaare AT bzw. GC durch HQ-vermittelte Basenpaare ersetzt. Die für die Ladungstransferexperimente verwendeten Oligonukleotide sind in Abb. 133 dargestellt.

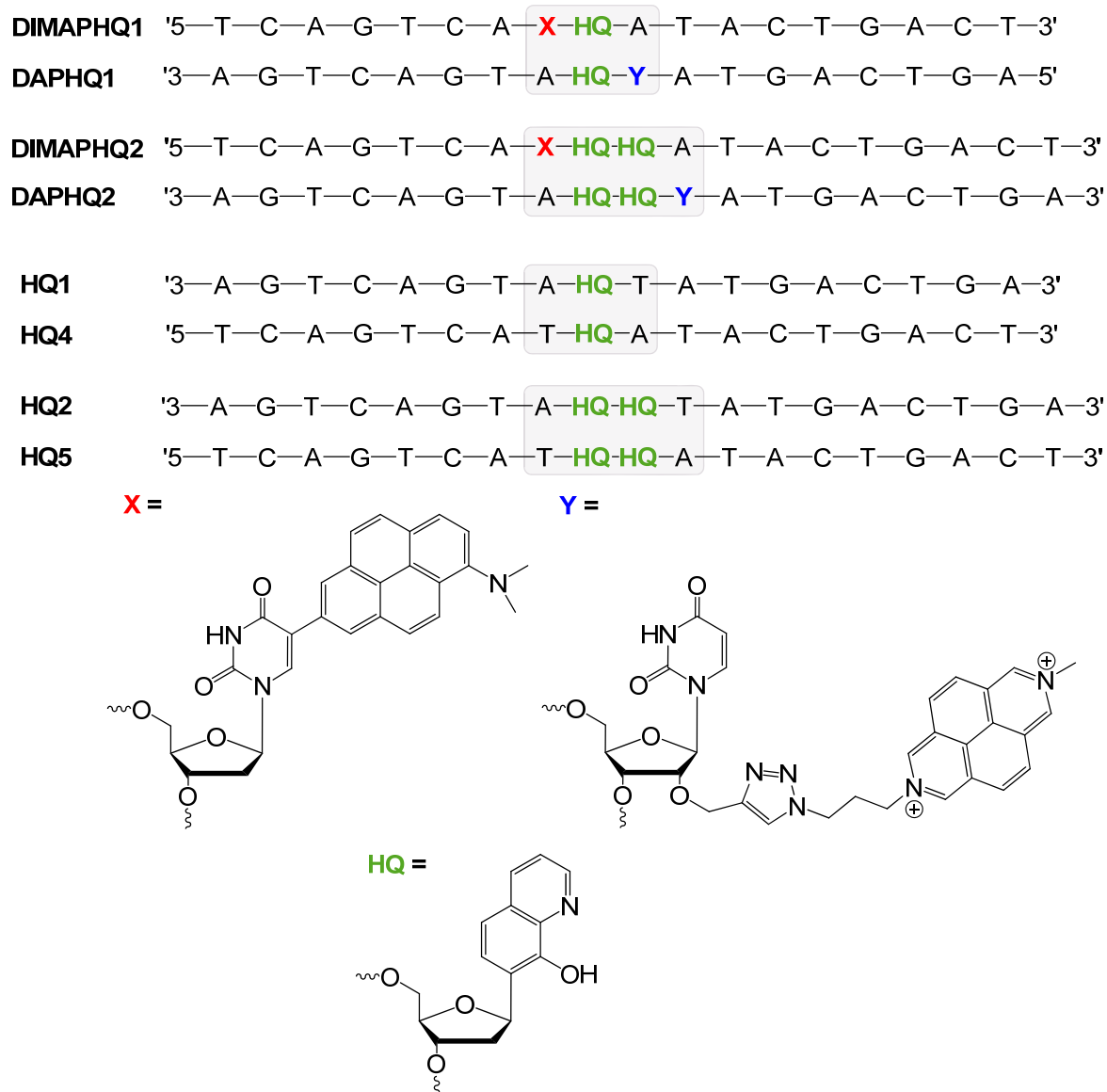


Abb. 133: Übersicht der Oligonukleotide zur Untersuchung des Ladungstrfers zwischen DIMAPdU und DAP^{2+} über HQ-vermittelte Basenpaare.

Zunächst musste gezeigt werden, dass es durch Zugabe von Cu^{2+} -Ionen zur Ausbildung metallionenvermittelter Basenpaare innerhalb der für die Untersuchung des Ladungstrfers verwendeten Duplexe kommt. Dazu wurden die Absorptionsspektren der Duplexe **DIMAPHQ1/HQ1**, **DIMAPHQ2/HQ2**, **DAPHQ1/HQ4**, **DAPHQ2/HQ5**, **DIMAPHQ1/DAPHQ1** und **DIMAPHQ2/DAPHQ2** jeweils in Anwesenheit von EDTA ($c = 10 \mu\text{M}$) und in Anwesenheit von Cu^{2+} -Ionen aufgenommen. Exemplarisch sind die entsprechenden Spektren für **DIMAPHQ2/HQ2**, **DAPHQ2/HQ5** und **DIMAPHQ2/DAPHQ2** mit je zwei HQ-vermittelten Basenpaaren in Abb. 134 dargestellt.

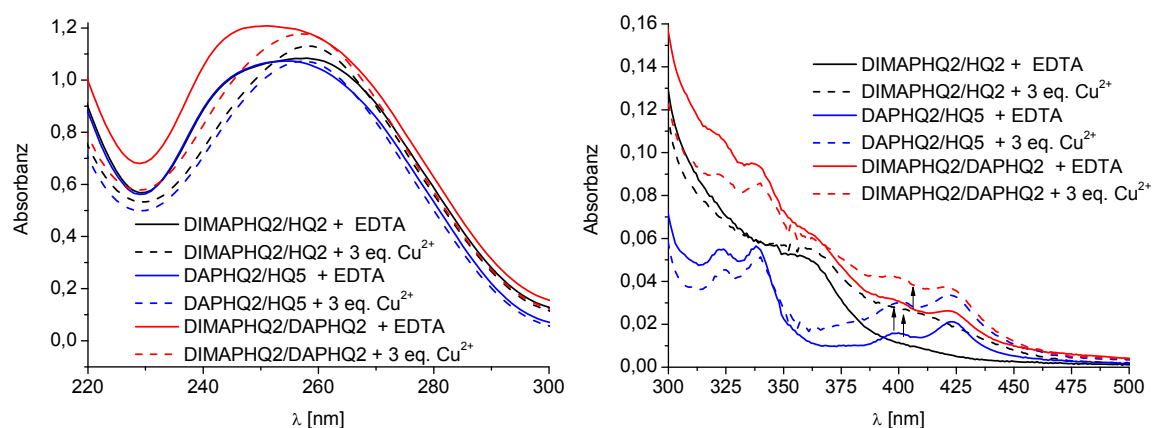


Abb. 134: Absorptionsspektren der Duplexe **DIMAPHQ2/HQ2**, **DAPHQ2/HQ5** und **DIMAPHQ2/DAPHQ2** in Anwesenheit von EDTA ($c = 10 \mu\text{M}$) bzw. von 3 eq. Cu^{2+} .

Wie bereits in Kapitel 5.2 erläutert, kommt es durch die Komplexbildung von Cu^{2+} -Ionen zu charakteristischen Veränderungen in den Absorptionsspektren der Oligonukleotide. Im Bereich der DNA-Absorption kommt es zu einer bathochromen Verschiebung des Maximums und zu einer Aufhebung der Verzerrung der DNA Bande. Zusätzlich kommt es zu einer verstärkten Absorption im Bereich um $\lambda = 400 \text{ nm}$, die durch den $\text{Cu}(\text{HQ})_2$ -Komplex hervorgerufen wird. In Abb. 134 kann man beide Effekte deutlich erkennen. Für die Oligonukleotid-Duplexe mit weniger HQ-Basenpaaren lassen sich die gleichen Beobachtungen machen, allerdings sind die Effekte weniger ausgeprägt.

Um die Ausbildung metallionenvermittelter Basenpaare zweifelsfrei nachzuweisen, wurden neben den Absorptionsspektren auch die Schmelztemperaturen aller Duplexe in Anwesenheit von EDTA ($c = 10 \mu\text{M}$) bzw. Cu^{2+} -Ionen bestimmt. Die entsprechenden T_m -Werte sind in Tabelle 22 wiedergegeben.

Tabelle 22: Schmelztemperaturen der Duplexe **DIMAPHQ1/HQ1**, **DIMAPHQ2/HQ2**, **DAPHQ1/HQ4**, **DAPHQ2/HQ5**, **DIMAPHQ1/DAPHQ1** und **DIMAPHQ2/DAPHQ2** jeweils in Anwesenheit von EDTA bzw. Cu^{2+} .

Duplex	T_m (EDTA) [$^{\circ}\text{C}$]	T_m (Cu^{2+}) [$^{\circ}\text{C}$]	ΔT_m [$^{\circ}\text{C}$]
DIMAPHQ1/HQ1	60.7	80.6	+19.9
DIMAPHQ2/HQ2	58.7	> 80	> +20
DAPHQ1/HQ4	59.2	77.4	+18.2
DAPHQ2/HQ5	60.9	> 80	> +20

DIMAPHQ1 / DAPHQ1	59.4	73.5	+14.1
DIMAPHQ2 / DAPHQ2	58.3	> 80	> +20

Aufgrund des teilweise sehr flachen Verlaufs der Schmelzkurven und der z.T. sehr hohen T_m -Werte konnten die Schmelztemperaturen nicht für alle Duplexe exakt bestimmt werden. Allerdings sind die T_m -Werte der mit Cu^{2+} -Ionen versetzten Duplexe in allen Fällen deutlich höher als die der entsprechenden mit EDTA versetzten Duplexe. In Abb. 135 sind exemplarisch die Schmelzkurven der Duplexe **DIMAPHQ2/HQ2**, **DAPHQ2/HQ5** und **DIMAPHQ2/DAPHQ2** dargestellt.

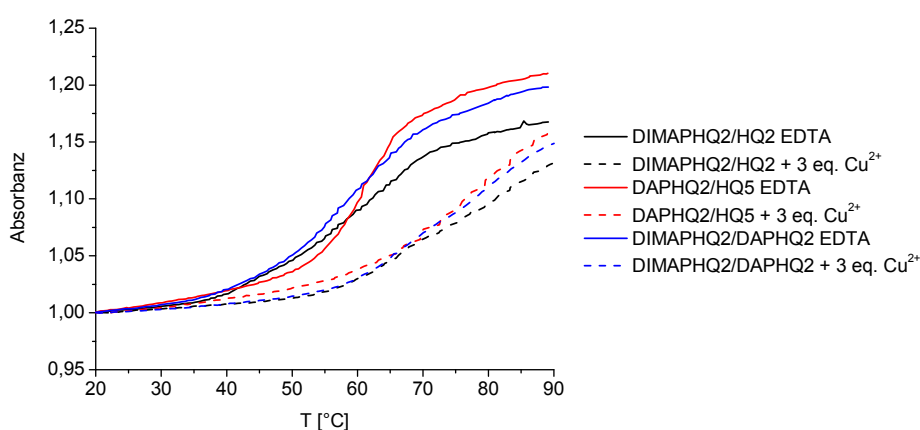


Abb. 135: Schmelzkurven der Duplexe **DIMAPHQ2/HQ2**, **DAPHQ2/HQ5** und **DIMAPHQ2/DAPHQ2** in Anwesenheit von EDTA ($c = 10 \mu\text{M}$) bzw. von 3 eq. Cu^{2+} .

Es konnte eindeutig gezeigt werden, dass die Cu^{2+} -Komplexierung funktioniert und es zur Ausbildung metallionenvermittelter Basenpaarungen kommt. Außerdem fällt beim Vergleich der T_m -Werte der mit EDTA versetzten Proben (vgl. Tabelle 22) mit den entsprechenden Duplexen mit AT-Basenpaaren anstelle der HQ-Modifikationen (vgl. Tabelle 21) auf, dass die T_m -Werte der HQ-Duplexe tendenziell sogar etwas erhöht sind. Dies lässt sich, wie bereits in Kapitel 5.2 erwähnt, auf die Ausbildung relativ stabiler hydrophober Basenpaare zurückführen und kann als Indiz für gute π - π -Stapelungswechselwirkungen im Bereich der HQ-Modifikationen angesehen werden.

In den Absorptionsspektren der mit EDTA versetzten HQ-Duplexe (Abb. 136 links) lässt sich nur ein geringer Einfluss der Hydroxychinolin-Modifikation erkennen. Lediglich die Absorption der Duplexe mit DAP^{2+} wird durch die in Nachbarschaft befindlichen HQs etwas stärker beeinflusst. Die DAP^{2+} -Absorption im

Wellenlängenbereich $\lambda = 390 \text{ nm} - 450 \text{ nm}$ nimmt mit steigender Anzahl der benachbarten HQ-Basenpaare leicht ab. Der Einfluss der HQ-Modifikationen auf die DAP^{2+} -Absorption ist nicht weiter verwunderlich, da DAP^{2+} in den Duplex interkaliert und somit sehr stark mit den Nachbarbasen wechselwirkt. *Becker et al.* beobachteten einen ähnlichen hypochromen Effekt auf die langwellige Absorptionsbande bei der Interkalation von freiem DAP^{2+} in DNA.^[385]

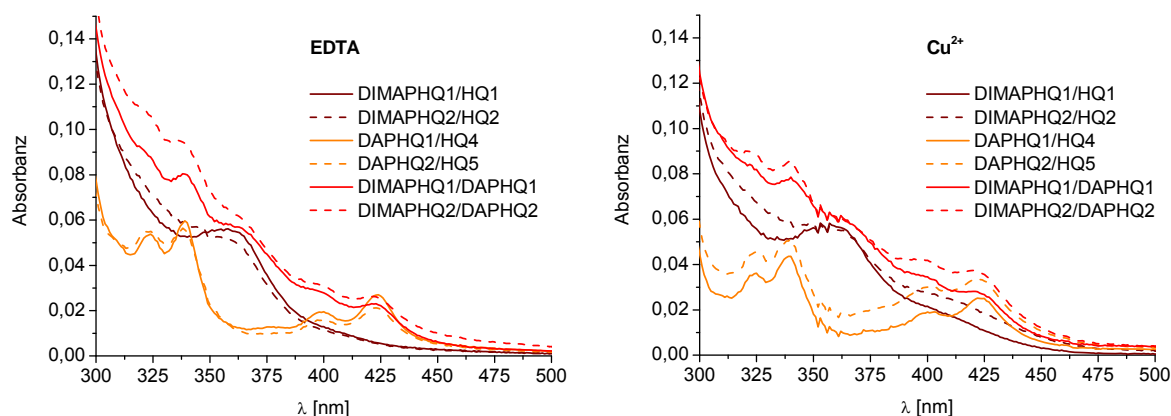


Abb. 136: Absorptionsspektren der mit EDTA (links) bzw. Cu^{2+} -Ionen (rechts) versetzten Oligonukleotide **DIMAPHQ1/HQ1**, **DIMAPHQ2/HQ2**, **DAPHQ1/HQ4** und **DAPHQ2/HQ5**, sowie der Ladungstransfer-Duplexe **DIMAPHQ1/DAPHQ1** und **DIMAPHQ2/DAPHQ2**.

In den Absorptionsspektren der mit Cu^{2+} -Ionen versetzten Oligonukleotide (Abb. 136 rechts) erkennt man deutlich den Einfluss der $\text{Cu}(\text{HQ})_2$ -Absorption im Bereich $\lambda = 300 - 450 \text{ nm}$. Je nach Anzahl der HQ-Modifikationen ist der Effekt unterschiedlich stark ausgeprägt.

In den Emissionsspektren der mit EDTA versetzten Duplexe (Abb. 137) lässt sich erkennen, dass die DIMAPdU-Emission ($\lambda_{\text{max}} = 406 \text{ nm}$) bereits in den Oligonukleotiden **DIMAPHQ1/HQ1** und **DIMAPHQ2/HQ2** also in Abwesenheit von DAP^{2+} als Elektronenakzeptor, sehr stark gelöscht ist. Dies spricht für eine sehr effiziente Elektroneninjektion in den Basenstapel. Vermutlich sind die starken π - π -Wechselwirkungen zwischen DIMAPdU und den hydrophoben HQ-Basenpaaren für die effiziente Ladungsinjektion verantwortlich. Das Reduktionspotential von 8-Hydroxychinolin beträgt $E_{\text{red}}(\text{HQ}) = -2.3 \text{ V vs Ag/Ag}^+ (-2.1 \text{ V vs NHE})$ ^[391] und ist damit deutlich stärker negativ als für die Pyrimidinbasen. Eine verstärkte Ladungsinjektion aufgrund einer erhöhten Triebkraft kann daher ausgeschlossen

werden. In den Ladungstransferduplexen **DIMAPHQ1/DAPHQ1** und **DIMAPHQ2/DAPHQ2** lässt sich kaum noch ein Beitrag der DIMAPdU-Emission erkennen. Die Anwesenheit des Elektronenakzeptors hat demnach Einfluss auf die Rate der Ladungsinjektion, da dadurch die Triebkraft für den Ladungstransfer erhöht wird.

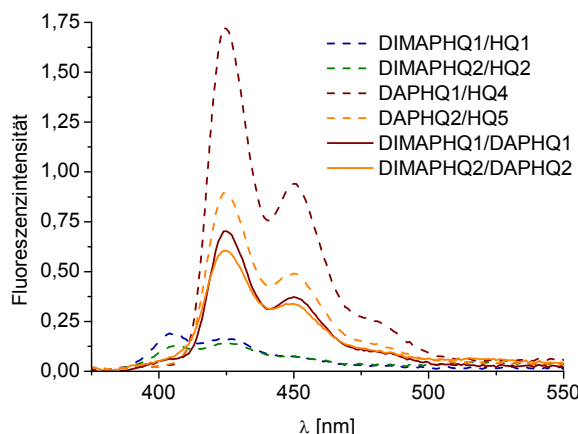


Abb. 137: Emissionsspektren der mit EDTA ($c = 10 \mu\text{M}$) versetzten Oligonukleotide **DIMAPHQ1/HQ1**, **DIMAPHQ2/HQ2**, **DAPHQ1/HQ4** und **DAPHQ2/HQ5**, sowie der Ladungstransfer-Duplexe **DIMAPHQ1/DAPHQ1** und **DIMAPHQ2/DAPHQ2** bei einer Anregungswellenlänge $\lambda_{\text{ex}} = 339 \text{ nm}$.

Die Emissionen der Oligonukleotide **DAPHQ1/HQ4** und **DAPHQ2/HQ5** (Abb. 137) sind im Vergleich zu den entsprechenden Duplexen mit AT-Basenpaaren an Stelle der HQ-Basenpaare (vgl. Abb. 129 rechts unten) stark gelöscht. Dies lässt sich anhand des niedrigen Oxidationspotentials für HQ ($E_{\text{ox}}(\text{HQ}) = 0.8 \text{ V vs Ag/Ag}^+; \sim 1.0 \text{ V vs NHE}$) im Vergleich zu A ($E_{\text{ox}} = 1.4 \text{ V vs NHE}$) erklären.^[391] Die Triebkraft des Ladungstransfers von photoangeregtem DAP^{2+} auf HQ ist damit etwa 0.4 eV größer als die des Lochtransfers auf A und es kommt zu einer verstärkten Löschung der DAP^{2+} -Emission in den HQ-modifizierten Oligonukleotiden. Beim Vergleich der Emissionen der nur mit DAP^{2+} und HQ modifizierten Duplexe (**DAPHQ1/HQ4** und **DAPHQ2/HQ5**) und der Ladungstransferduplexe (**DIMAPHQ1/DAPHQ1** und **DIMAPHQ2/DAPHQ2**) lässt sich für den oxidativen Lochtransfer von photoangeregtem DAP^{2+} auf DIMAPdU eine distanzabhängige Fluoreszenzlöschung für die Ladungstransferduplexe erkennen. Während die DAP^{2+} -Emission von **DIMAPHQ1/DAPHQ1** im Vergleich zu der des Referenzduplexes **DAPHQ1/HQ4** um etwa 58% gelöscht wird, ist die Emission von **DIMAPHQ2/DAPHQ2** gegenüber der von **DAPHQ2/HQ5** nur noch um etwa 22 % verringert (vgl. Tabelle 23). Allerdings ist

die Emission von **DAPHQ2/HQ5** gegenüber der von **DAPHQ1/HQ4** bereits deutlich gelöscht, was eine Aussage über veränderte Ladungstransferraten aufgrund eines Vergleichs der Fq-Werte schwierig macht.

Dennoch kann man aufgrund der gemachten Messungen davon ausgehen, dass sowohl der reduktive Elektronentransfer von DIMAPdU* auf DAP^{2+} , als auch der oxidative Lochtransfer von DAP^{2+*} auf DIMAPdU über ein und zwei hydrophobe HQ-Basenpaare funktioniert. Man muss an dieser Stelle allerdings noch einmal betonen, dass aus statischen Fluoreszenzmessungen lediglich eine Emissionslöschung durch Ausbildung eines nicht-emittierenden ladungsgetrennten Zustands zu erkennen ist. Darüber ob die Ladung tatsächlich am Akzeptor ankommt und über die Ratenkonstanten der beteiligten Prozesse kann anhand statischer Fluoreszenzmessungen keine Aussage gemacht werden. Dafür wären beispielsweise transiente Absorptionsmessungen nötig um das, beim reduktiven Elektronentransfer entstehende, DAP^{+*} -Akzeptorradikal direkt nachzuweisen.

Die Emissionsspektren der mit CuCl_2 versetzten Oligonukleotide (Abb. 138) unterscheiden sich auf den ersten Blick nicht sehr stark von denen der EDTA-Proben (Abb. 137). Bei genauerer Betrachtung fallen dennoch wesentliche Unterschiede auf. Die DIMAPdU-Emission ($\lambda_{\text{max}} = 406 \text{ nm}$) ist bereits in den Duplexen ohne DAP^{2+} als Elektronenakzeptor (**DIMAPHQ1/HQ1** und **DIMAPHQ2/HQ2**) annähernd komplett gelöscht. Dies spricht für eine sehr effiziente Elektroneninjektion in den Basenstapel. Eine Erklärung hierfür liefert das geringe Reduktionspotential des $\text{Cu}^{\text{II}}(\text{HQ})_2$ -Komplexes ($E_{\text{red}}(\text{Cu}^{\text{II}}\text{HQ}_2) = -0.48 \text{ V vs Ag/AgCl; } -0.28 \text{ vs NHE}$).^[392, 393] Man erhält somit näherungsweise eine Triebkraft für die Elektronenübertragung von DIMAPdU* auf $\text{Cu}^{\text{II}}(\text{HQ})_2$ von $\Delta G = -1.9 \text{ eV}$.

Auch für den oxidativen Ladungstransfer zeigen sich Unterschiede zwischen den mit Cu^{2+} -Ionen (Abb. 138) und den mit EDTA (Abb. 137) versetzten Oligonukleotiden. Die Löschung der DAP^{2+} -Emission (im Vergleich zu den entsprechenden Duplexen mit AT-Basenpaaren anstelle der HQ-Basenpaare) ist für die Cu^{2+} -Proben etwas größer. Außerdem wird die Fluoreszenz der Ladungstransferduplexe (**DIMAPHQ1/DAPHQ1** und **DIMAPHQ2/DAPHQ2**) gegenüber den Duplexen ohne DIMAPdU als Lochakzeptor (**DAPHQ1/HQ4** und **DAPHQ2/HQ5**) stärker gelöscht. Verursacht wird dies wahrscheinlich durch die stabilere metallionenvermittelte

Basenpaarung und dadurch verbesserte π - π -Wechselwirkungen zwischen DAP²⁺ bzw. DIMAPdU und den HQ-Basenpaaren. Eventuell spielen hier auch Kation- π -Wechselwirkungen zwischen dem Cu²⁺-Zentralion und dem aromatischen π -System von DAP²⁺ eine Rolle.

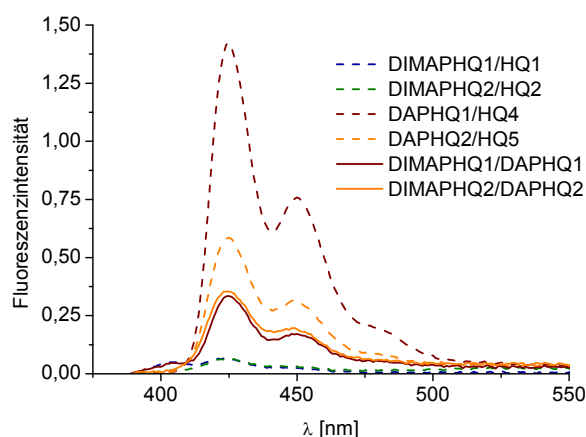


Abb. 138: Emissionsspektren der mit Cu²⁺ versetzten Oligonukleotide **DIMAPHQ1/HQ1**, **DIMAPHQ2/HQ2**, **DAPHQ1/HQ4** und **DAPHQ2/HQ5**, sowie der Ladungstransfer-Duplexe **DIMAPHQ1/DAPHQ1** und **DIMAPHQ2/DAPHQ2** bei einer Anregungswellenlänge $\lambda_{\text{ex}} = 339$ nm.

Die Fq-Werte für die Emissionslöschung der Ladungstransferduplexe sind in Tabelle 23 zusammengestellt. Als Referenz wurden jeweils die entsprechenden, nur mit DIMAPdU und HQ bzw. nur mit DAP²⁺ und HQ modifizierten Duplexe verwendet. Die Fq-Werte für die DIMAP-Emission wurden anhand der Fluoreszenzintensität bei $\lambda = 406$ nm bestimmt, für die Berechnung der Fq-Werte der DAP²⁺-Emission wurde die integrierte Fluoreszenzintensität herangezogen. Die Fq-Werte für die DIMAP-Emission der mit Cu²⁺-Ionen versetzten DIMAPHQ/DAPHQ Duplexe konnten aufgrund der zu geringen Emission der Referenzduplexe nicht ermittelt werden.

Tabelle 23: Emissionslöschung der HQ-modifizierten Ladungstransferduplexe in Gegenwart von EDTA bzw. Cu²⁺.

Duplex	Fq [%] (DIMAPdU)	Fq [%] (DAP ²⁺)	Fq [%] (DAP ²⁺)
	10 μ M EDTA	10 μ M EDTA	Cu ²⁺
DIMAPHQ1 / DAPHQ1	67	58	72
DIMAPHQ2 / DAPHQ2	46	22	29

Um den Effekt der Ausbildung von metallionenvermittelten Basenpaaren auf das Emissionsverhalten der Oligonukleotide noch einmal zu verdeutlichen sind in Tabelle

24 die Fq-Werte der mit Cu^{2+} -Ionen versetzten Proben gegenüber den mit EDTA versetzten Proben als Referenz angegeben.

Tabelle 24: Emissionslöschung der mit CuCl_2 versetzten HQ-modifizierten Oligonukleotide gegenüber den entsprechenden mit EDTA versetzten HQ-modifizierten Oligonukleotiden

Duplex	Fq [%] (10uM EDTA)	Fq [%] (DIMAP) Cu^{2+}	Fq [%] (DAP^{2+}) Cu^{2+}
DIMAPHQ1/HQ1	0	72	---
DIMAPHQ2/HQ2	0	84	---
DAPHQ1/HQ4	0	---	21
DAPHQ2/HQ5	0	---	37
DIMAPHQ1 / DAPHQ1	0	n.d.	48
DIMAPHQ2 / DAPHQ2	0	n.d.	48

Die Fq-Werte der DIMAP-Emission beziehen sich auf den Wert bei $\lambda = 406 \text{ nm}$, da bei längeren Wellenlängen auch HQ eine geringe Emission zeigt. Die Fq-Werte der DAP^{2+} -Emission wurden anhand der integrierten Fluoreszenz bestimmt. Man erkennt sehr deutlich, dass DIMAPdU-Emission für die Duplexe **DIMAPHQ1/HQ1** und **DIMAPHQ2/HQ2** durch Cu^{2+} -Zugabe deutlich abnimmt. Wie bereits kurz erwähnt lässt sich dies auf das geringe Reduktionspotential der gebildeten $\text{Cu}^{\text{II}}(\text{HQ})_2$ -Komplexe zurückführen. Auch die DAP^{2+} -Emission der Duplexe **DAPHQ1/HQ4** und **DAPHQ2/HQ5** wird durch Cu^{2+} -Zugabe verringert. Dies kommt durch die verbesserten π - π -Wechselwirkungen infolge der Ausbildung der metallionenvermittelten Basenpaare und den dadurch verstärkten oxidativen Lochtransfer von DAP^{2+*} auf HQ zustande. Für die Ladungstransferduplexe **DIMAPHQ1/DAPHQ1** und **DIMAPHQ2/DAPHQ2** konnten aufgrund der schon in den Referenzduplexen komplett gelöschten Emission keine Fq-Werte für DIMAPdU bestimmt werden. Die Löschung der DAP^{2+} Emission infolge der Cu^{2+} -Zugabe ist in allen Fällen etwas größer als für die DAP-Duplexe ohne Lochakzeptor (**DAPHQ1/HQ4** und **DAPHQ2/HQ5**). Erklären kann man den verstärkten Einfluss der metallionenvermittelten Basenpaare wie folgt. In den DAP-Duplexen ohne Akzeptor bewirkt die Ausbildung der metallionenvermittelten Basenpaare lediglich eine verbesserte elektronische Kopplung zwischen den Lochdonor und dem Basenstapel.

In den Ladungstransferduplexen wird zusätzlich noch die Kopplung zwischen Lochakzeptor und Basenstapel verbessert. Diesen verstärkten Einfluss von Cu^{2+} in den Ladungstransferduplexen kann man wieder als Hinweis auf einen funktionierenden Ladungstransfer sehen. Allerdings müssen hier wieder die bereits erwähnten Einschränkungen für statische Emissionsmessungen gemacht werden.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass sowohl der oxidative Lochtransfer als auch der reduktive Elektronentransfer über hydroxychinolinvermittelte Basenpaare funktioniert. Dies gilt für hydrophobe und metallionenvermittelte HQ-Basenpaare. Damit stellt diese Arbeit das erste Beispiel für einen Ladungstransfer, der durch metallionenvermittelte Basenpaare abläuft dar.

8 Zusammenfassung

Neue Fluoreszenzsonden für die DNA-Analytik

Im ersten Teil der Arbeit konnte gezeigt werden, dass sich die „Mega-Stokes“-Farbstoffe **M1** – **M3** (Abb. 139) postsynthetisch mittels „Klick-Chemie“ an Oligonukleotide knüpfen lassen. Die Basenpaarungseigenschaften der Oligonukleotide werden durch die Modifikation nicht signifikant beeinträchtigt. Die Quantenausbeute aller drei Fluoreszenzfarbstoffe steigt durch die Anknüpfung an Oligonukleotide deutlich an, die großen Stokes-Verschiebungen werden hingegen kaum beeinflusst. Damit stellen die Fluorophore **M1** und **M2** aufgrund ihrer großen Emissionswellenlängen, den relativ hohen Quantenausbeuten von 23% bzw. 33% in Oligonukleotidduplexen und ihrer großen Stokes-Verschiebungen von mehr als 100 nm vielversprechende Sonden für die Markierung biologischer Proben dar. Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass FRET-Prozesse sowohl von **M1** auf **M2** als auch von **M1** auf **M3** mit hoher Effizienz funktionieren.

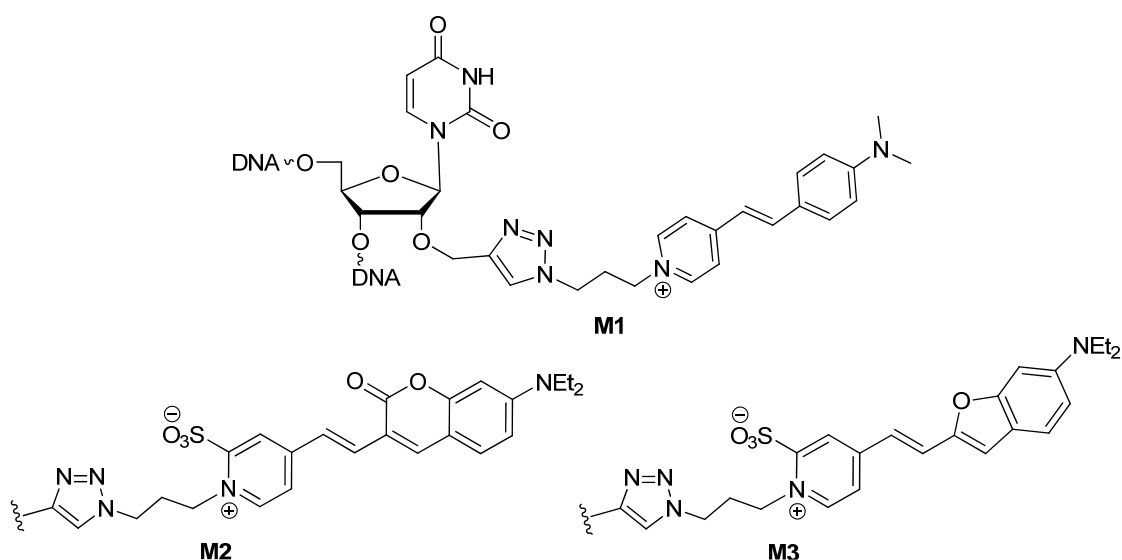
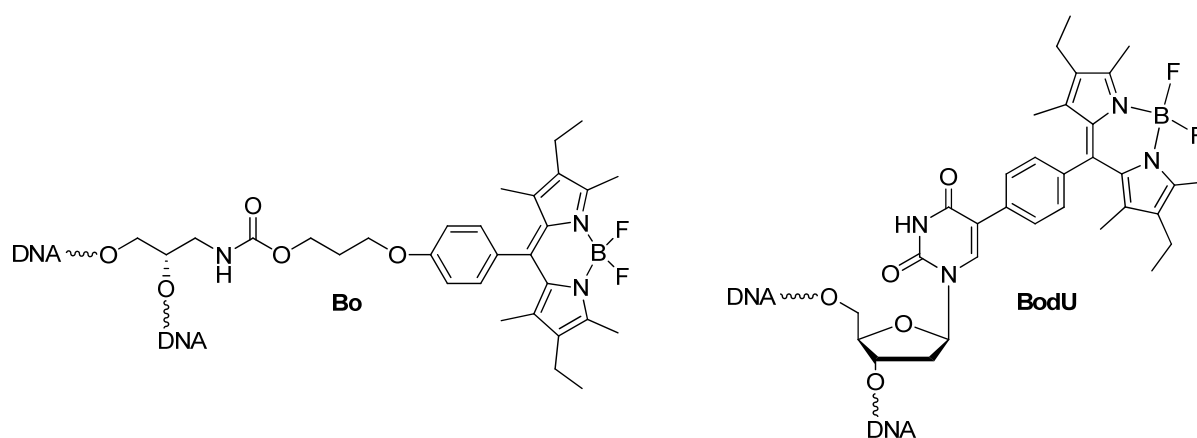
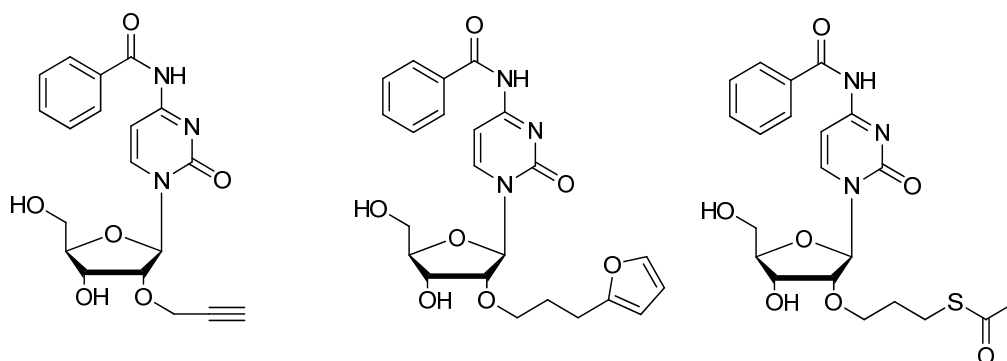


Abb. 139: Struktur der mit DNA verknüpften Farbstoffe **M1** – **M3**

Der Phosphoramiditbaustein des Bodipy-Basensurrogates **Bo** konnte in vier Stufen synthetisiert und mittels Festphasensynthese in Oligonukleotide eingebaut werden. Die **Bo**-modifizierten Oligonukleotide weisen extrem hohe Fluoreszenzintensitäten mit Quantenausbeuten von bis zu $\Phi_F = 0.88$ in einzelsträngigen Oligonukleotiden auf und übertreffen sequenzgleiche, mit Fluorescein markierte Oligonukleotide in der



Es konnten drei unterschiedlich funktionalisierte Cytidin-Derivate (Abb. 141) für die postsynthetische DNA-Modifikation nach einem relativ einfachen Syntheseverfahren und mit hohen Ausbeuten synthetisiert werden. Der Vorteil der beschriebenen Syntheseroute besteht in der breiten Anwendbarkeit, so kann sie prinzipiell für die 2'-OH-Modifikation aller vier natürlichen Nukleoside mit verschiedensten Alkylhalogeniden eingesetzt werden.



168

Metallkomplex/DNA-Konjugate

Im zweiten Teil der Arbeit wurde der Phosphoramiditbaustein des Hydroxychinolin-Ligandosids (HQ) in einer zehnstufigen Synthese dargestellt und mittels DNA-Festphasensynthese in Oligonukleotide eingebaut. Der Schlüsselschritt der Synthese ist eine stereoselektive Heck-Kupplung zwischen dem Glykal **24** und 7-Iodochinolin-8-yl-pivalat (**26**). Es konnte sowohl anhand der Schmelztemperaturen als auch anhand der UV/Vis-Absorption zweifelsfrei nachgewiesen werden, dass sich in Oligonukleotidduplexen mit gegenüberliegenden HQ-Modifikationen durch Zugabe von Cu^{2+} extrem stabile metallionenvermittelte Basenpaare ausbilden. Der Ersatz eines einzigen natürlichen Basenpaars durch ein Cu^{2+} -vermitteltes HQ-Basenpaar hat eine Erhöhung des T_m -Wertes um mehr als 20°C zur Folge. Es konnte außerdem gezeigt werden, dass auf diese Weise mehrere Cu^{2+} -Ionen in benachbarten metallionenvermittelten Basenpaaren innerhalb der DNA-Helix platziert werden können.

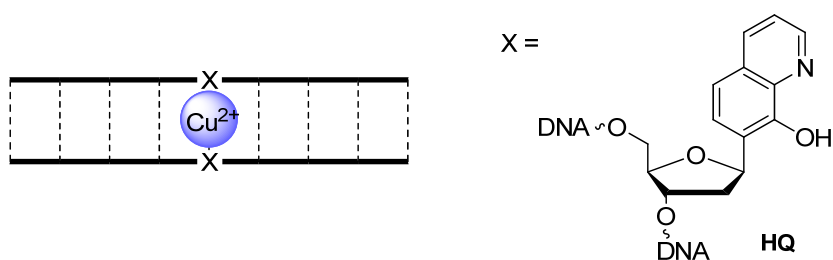


Abb. 142: Struktur von HQ in DNA und metallionenvermittelte Basenpaarung.

Um die Verknüpfung verschiedener Oligonukleotidduplexe durch unterschiedliche Metallionen zu untersuchen, wurde der Phosphoramiditbaustein des in 5-Position mit Terpyridin funktionalisierten Uridinderivates TerpdU (vgl. Abb. 143) in neun Stufen synthetisiert und mittels automatisierter Festphasensynthese in Oligonukleotide eingeführt. Es konnte gezeigt werden, dass der unkomplexierte TerpdU-Baustein je nach Position in den Oligonukleotiden und der Basenumgebung ein unterschiedliches Emissionsverhalten zeigt. Dies konnte auf die Ausbildung eines starken hydrophoben Terpyridin-Basenpaares und Ladungstransferprozesse zwischen Terpyridin und den DNA-Basen zurückgeführt werden. Durch Titrations- und Gelelektrophorese-Experimente konnte nachgewiesen werden, dass es möglich ist, TerpdU-modifizierte Oligonukleotide über Metall-komplexe „end on“ und „side on“ zu Dimeren zu verknüpfen. Die Bildung größerer Aggregate wurde für die „end on“ Koordination eindeutig belegt. Die Bindungsstärke und Reversibilität der

Komplexierung lässt sich einfach durch die Wahl des Zentralions steuern. Diese Arbeit stellt somit das erste Beispiel für einen Aufbau größerer DNA-Strukturen über einen derartig rigide an Oligonukleotide geknüpften Liganden dar und lässt in Gegensatz zu allen bisherigen metallvermittelten Oligonukleotidverknüpfungen die Möglichkeit einer elektronischen Kopplung zwischen den Oligonukleotiden und dem Metallkomplex zu. Dadurch wäre es theoretisch möglich, Ladungen von einem DNA-Duplex über den Terpyridin-Komplex in einen anderen DNA-Duplex zu transferieren und somit einen großen Schritt in Richtung komplexer Nanoleiter zu machen.

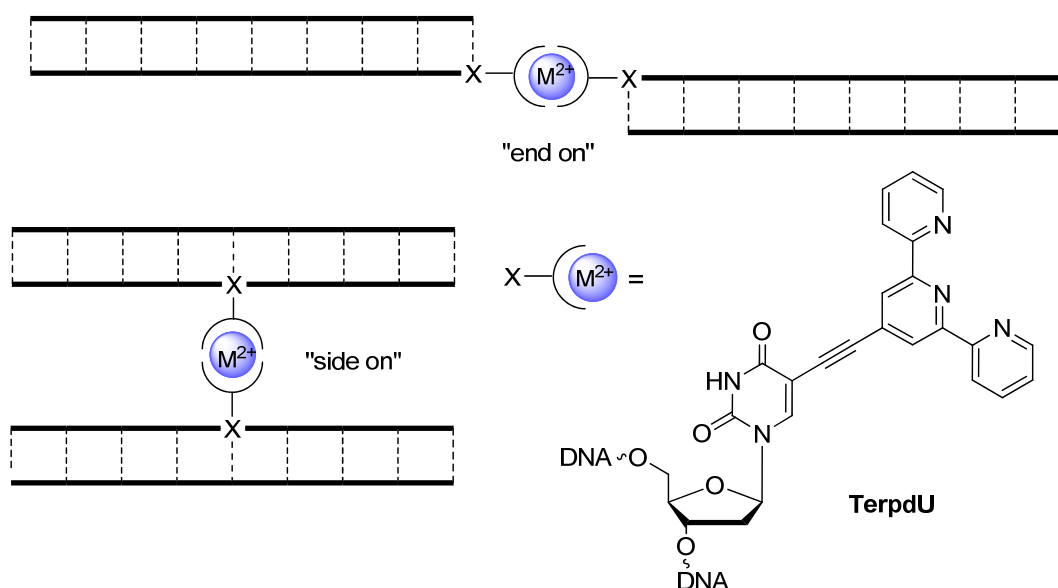


Abb. 143: Struktur des terpyridinmodifizierten Uridins (TerpdU) in DNA und Verknüpfung von Oligonukleotiden über Terpyridin-Komplexe

Entwicklung neuer Ladungstransfersysteme

Im dritten Teil der Arbeit wurde der nukleosidische Elektronendonator DIMAPdU in fünf Stufen synthetisiert. Die Schlüsselschritte der Synthese sind die iridiumkatalysierte regioselektive Borylierung von 1-(*N,N*-Dimethylamino)-pyren (DIMAP) und die anschließende Suzuki-Kreuzkupplung mit 5-Iodo-2'-deoxyuridin.

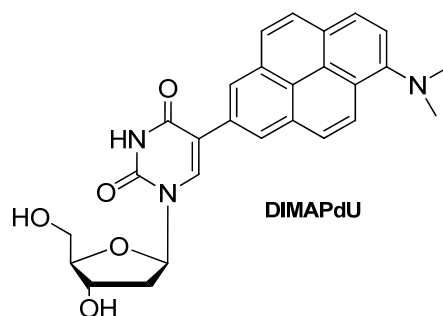


Abb. 144: Struktur des neu entwickelten nukleosidischen Elektronendonors DIMAPdU

Der DIMAPdU-Nukleosidbaustein wurde spektroskopisch und elektrochemisch charakterisiert. Die Emission von DIMAPdU ist im Vergleich zu DIMAP nahezu quantitativ gelöscht. Dies konnte anhand transienter Absorptionsmessungen auf die rasche Ausbildung eines nicht-emittierenden ladungsgetrennten $\text{DIMAP}^{+\bullet}\text{dU}^{\bullet-}$ - Zustands zurückgeführt werden. Anhand der ermittelten Redoxpotentiale im angeregten Zustand kann davon ausgegangen werden, dass photoangeregtes DIMAP^*dU in der Lage ist, T und C zu reduzieren, nicht jedoch G oder A zu oxidieren. Im Gegensatz zu 1PydU und 2PydU handelt es sich um einen reinen Elektronendonator bzw. Lochakzeptor. Die bei der Oxidation und Reduktion von DIMAP und DIMAPdU entstehenden Radikale wurden spektroskopisch charakterisiert. Die erhaltenen Spektren für die Reduktion von DIMAPdU sind denen für 2PydU sehr ähnlich, was für eine geringe elektronische Kopplung zwischen DIMAP und dU spricht. Diese Annahme wird durch die strukturierte pyrenartige Emission von DIMAPdU in Oligonukleotiden unterstützt. Die schwache Fluoreszenz des DIMAPdU-Nukleosidbausteins wird in Oligonukleotiden durch Elektronentransfer auf die Pyrimidinbasen weiter verringert. Die Elektroneninjektion in den DNA-Basenstapel konnte anhand transienter Absorptionsmessungen zeitlich verfolgt werden.

Bei der Untersuchung neuer Ladungstransfersysteme konnte anhand statischer Fluoreszenzmessungen gezeigt werden, dass der DNA-vermittelte oxidative Lochtransfer (HT) von photoangeregtem NRdU (vgl. Abb. 145) auf DIMAPdU im Grundzustand funktioniert. DIMAPdU lässt sich also als Lochakzeptor bei der Untersuchung des HT einsetzen. In einem zweiten Ladungstransfersystem wurde der DNA-vermittelte Elektronentransfer (EET) von photoangeregtem DIMAPdU auf *N*-Phenylsulfonylindol als Elektronenakzeptor untersucht. Es wurde festgestellt, dass der EET stark von der Basensequenz zwischen Elektronendonator und -akzeptor abhängt. Beim dritten untersuchten Ladungstransfersystem, dem DIMAPdU/ DAP^{2+} -System, handelt es sich um ein binäres System, an dem sich sowohl der oxidative Lochtransfer als auch der reduktive Elektronentransfer untersuchen lassen. Beim HT dient angeregtes $\text{DAP}^{2+\bullet}$ als Lochdonor und DIMAPdU als Lochakzeptor. Beim EET werden Elektronen vom angeregten DIMAP^*dU auf DAP^{2+} übertragen. Es konnte gezeigt werden, dass beide Prozesse funktionieren. Der EET läuft unabhängig von der Art und Anzahl (1-3) der Basenpaare zwischen DIMAPdU und DAP^{2+} mit sehr

großer Effizienz ab. Dies ist bemerkenswert, da Ladungstransferprozesse in kovalent an DNA geknüpften Donor-Akzeptor-Systemen normalerweise eine sehr steile Distanzabhängigkeit aufweisen und bereits über drei Basenpaare nur noch mit sehr geringer Effizienz ablaufen.^[116] Für den HT zeigt sich eine deutliche Abhängigkeit der Effizienz von der Art der Basenpaare zwischen dem angeregten Lochdonor DAP²⁺ und dem Lochakzeptor DIMAPdU. In den Ladungstransferduplexen mit AT-Basenpaaren läuft der HT deutlich effizienter ab als bei den entsprechenden Duplexen mit GC-Basenpaaren. Die Distanzabhängigkeit des Lochtransfers über AT-Basenpaare ist gering. Über die Distanzabhängigkeit des HT über GC-Basenpaare lässt sich aufgrund der durch Guanine gelöschten DAP²⁺-Emission keine verlässliche Aussage machen.

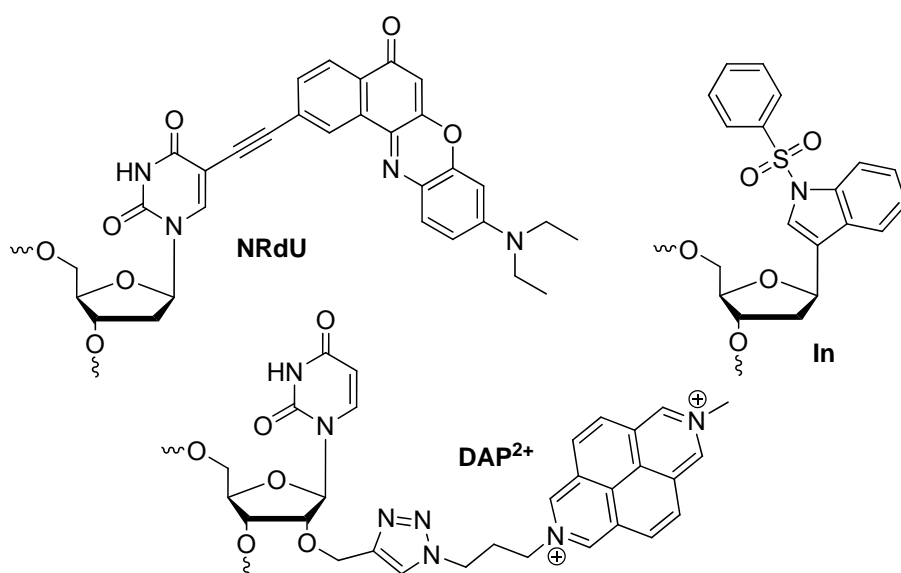


Abb. 145: Struktur der Ladungstransferpartner von DIMAPdU in Oligonukleotiden

Abschließend sollte untersucht werden, ob Elektronentransferprozesse auch über metallionenvermittelte Basenpaare ablaufen. Dazu wurde das neu entwickelte DIMAPdU/DAP²⁺ - System verwendet und die natürlichen Basenpaare zwischen Ladungsdonor und –akzeptor durch HQ-vermittelte Basenpaare ersetzt. Es konnte gezeigt werden, dass sowohl der oxidative Lochtransfer als auch der reduktive Elektronentransfer über hydroxychinolinvermittelte Basenpaare funktioniert. Dies gilt für hydrophobe und metallionenvermittelte HQ-Basenpaare. Damit stellt diese Arbeit das erste Beispiel für einen Ladungstransfer, der durch metallionenvermittelte Basenpaare abläuft dar.

9 Experimenteller Teil

9.1 Verbrauchsmaterialien und Geräte

Reagenzien und Lösungsmittel

Die bei der Synthese verwendeten Reagenzien wurden von den Firmen *ABCR*, *Alfa Aesar*, *Fluka*, *Merck*, *Riedel-de Haen* und *Sigma Aldrich* bezogen. Die verwendete Qualität war mindestens „zur Synthese“. Alle verwendeten Lösungsmittel besitzen mindestens die Qualitätsstufe p.A.. Technische Lösungsmittel wurden vor Verwendung destilliert, trockene Lösungsmittel wurden entweder nach Literaturvorschriften getrocknet^[394] oder von *Acros Organics*, *Alfa Aesar* und *Fluka* bezogen und unter Stickstoff aufbewahrt. Für die HPLC wurden hochgereinigte organische Lösungsmittel (*LiChrosolv*, *Merck*) sowie entionisiertes Wasser aus einer *Millipore*-Entsalzungsanlage verwendet.

Unmodifizierte Oligonukleotide

Unmodifizierte Oligonukleotide wurden ausschließlich von *Metabion* bezogen und waren bereits über HPLC gereinigt und lyophilisiert. Die Stoffmenge der gekauften Stränge variierte zwischen 0.2 und 1.0 μmol . Die DNA wurde vor ihrer Verwendung in entionisiertem Wasser aus einer *Millipore*-Entsalzungsanlage gelöst und ihre Konzentration über UV/Vis-Absorption bestimmt.

Reaktionsführung

Alle Reaktionen wurden zum Luft- und Feuchtigkeitsausschluss unter Stickstoffatmosphäre (Trocknung über BTS-Katalysator, konzentrierter Schwefelsäure, Kaliumhydroxid und Silicagel) bzw. unter Argonatmosphäre (Schweißargon 6.0, 99,99990% Reinheit) durchgeführt.

Chromatographie

- Dünnschichtchromatographie (DC)

Es wurden fertig beschichtete Aluminiumfolien der Firma *Merck* verwendet. Die Beschichtung besteht aus 60 F₂₅₄ Kieselgel mit einer Schichtdicke von 0.25 mm.

Visuelle Auswertung erfolgt über Fluoreszenzlöschung bei $\lambda = 254$ nm bzw. über Fluoreszenzanregung bei $\lambda = 366$ nm. Chemische Auswertung erfolgte gegebenenfalls durch Anfärben mit Schwefelsäure (3%) in Methanol und anschließendem Erwärmen mit einem Heißluftfön.

- **Flash-Säulenchromatographie (FC)**

Als stationäre Phase wurde Kieselgel der Firma *Aldrich* mit einer Korngröße von 40 – 63 μm verwendet. Die verwendete Säule wurde nass gepackt und nach dem Verfahren von *W. C. Still*^[395] bei einem Überdruck von 0.32 bar chromatographiert. Die zu reinigende Substanz wurde entweder im Laufmittel gelöst, oder auf Kieselgel absorbiert aufgetragen.

- **Hochdruck-Flüssigkeitschromatographie (HPLC)**

Reversed-Phase HPLC wurde mit einem *Shimadzu* HPLC-System durchgeführt (Autosampler SIL-10AD, Pumpenmodul LC-10AT, Steuereinheit SCL-10A, Multidiodenarray SPD-M10A, Fluoreszenzdetektor RF-10A XL). Für die Analytik aller modifizierten Oligonukleotide mit Ausnahme der **Bo**-Oligonukleotide wurde eine *Supelcosil* LC-318-Säule (25 cm x 4.6 mm, *Supelco*) verwendet, für die präparative Trennung eine *Supelcosil* LC-318 (25 cm x 10.0 mm ID, 5 μm , *Supelco*). Für DNA-Stränge, die **Bo** enthielten, wurde als Analytiksäule eine *Discovery*[®] *Bio Wide Pore* C5 (25 cm x 4.6 mm, 5 μm , *Supelco*) verwendet, für die präparative Trennung eine *Discovery*[®] *Bio Wide Pore* C5 (25 cm x 10 mm, 5 μm , *Supelco*).

Die entsprechende Säule wurde mit 50 mM Ammoniumacetat-Puffer (pH 6.5, Laufmittel A) equilibriert und mit einem Acetonitril-Gradienten (Laufmittel B) durchgeführt. Die Elution erfolgte mit einer Fließgeschwindigkeit von 1 mL/min (analytisch) bzw. 2.5 mL/min (präparativ). Die Detektion der Oligonukleotide erfolgte bei 260 nm, 290 nm und im Absorptionsmaximum der entsprechenden Modifikation.

Sublimationstrocknung

Wässrige Lösungen wurden an der Gefriertrocknungsanlage Alpha 1- 2 LD Plus von *Christ* nach Ausfrieren in flüssigem Stickstoff getrocknet.

DNA-Festphasensynthese

Die DNA-Festphasensynthese erfolgt an einem *Expedite 8909 Nucleic Acid Synthesizer* System von *Applied Biosystems*. Als Träger dienten CPGs mit 1 μmol Belegung (500 Å). Phosphoramidite, CPG-Säulen und Synthesizer-Chemikalien stammten von *Glen Research* und *Proligo*.

Massenspektrometrie (MS)

Massenspektren wurden durch die Betriebseinheit Zentrale Analytik, Massenspektrometrie der Universität Regensburg gemessen. Die Spektrometer werden nachfolgend kurz zusammengefasst.

- ESI-MS: *ThermoQuest Finnigan TSQ 7000*
- HR-ESI-MS: *Agilent Technologies 6540 UHD Accurate-Mass Q-TOF LC/MS*
- CI-MS: *Finnigan MAT SSQ 710 A*
- EI-MS: *Finnigan MAT SSQ 710 A*, *Finnigan MAT 95*:
- FAB-MS: *Finnigan MAT 95*

Die Angabe der Peaks erfolgt in m/z mit Angabe der Intensität in % des Basispeaks.

NMR-Spektroskopie

Kernresonanzspektren wurden an einem Bruker *Avance 300*, *Avance 400* oder *Avance 600-Kryo* durch die Betriebseinheit Zentrale Analytik, NMR-Spektroskopie der Universität Regensburg in deuterierten Lösungsmitteln gemessen. Die Proben befanden sich in Probenröhrchen von 5 mm Außendurchmesser und beinhalteten ca. 10 mg Substanz in 0.7 mL Lösungsmittel. 2D-Spektren enthielten 0.1 mmol Substanz in 0.7 mL Lösungsmittel. Chemische Verschiebungen δ werden in ppm angegeben und beziehen sich auf Tetramethylsilan als Nullpunkt. Als Referenz dient das Signal des unvollständig deuterierten Lösungsmittels.^[396]

- MeOD- d_4 : $^1\text{H-NMR}$: $\delta = 3.31$ ppm; $^{13}\text{C-NMR}$: $\delta = 49.0$ ppm
- DCM- d_2 : $^1\text{H-NMR}$: $\delta = 5.31$ ppm; $^{13}\text{C-NMR}$: $\delta = 53.7$ ppm
- CDCl_3 : $^1\text{H-NMR}$: $\delta = 7.26$ ppm; $^{13}\text{C-NMR}$: $\delta = 77.2$ ppm

Kopplungskonstanten J werden in Hz angegeben. Zur Kennzeichnung der Multiplizität der ^1H -Signale wurden die folgenden Abkürzungen verwendet: s

(Singulett), d (Dublett), t (Triplett), q (Quartett), dd (Dublett vom Dublett), td (Triplett vom Dublett), m (Multiplett).

Spektroskopie

Für alle spektroskopischen Messungen wurden Quarzglasküvetten der Firma *Starna* mit einer Schichtdicke von 1 cm verwendet. Während der spektroskopischen Untersuchung wurde das Spektrometergehäuse stetig mit Stickstoff gespült. Für die Messungen wurden hochgereinigte organische Lösungsmittel (*Uvasol®*, *Merck*) bzw. entionisiertes Wasser aus einer *Millipore*-Entsalzungsanlage verwendet. Soweit nicht anders angegeben, enthielten alle Oligonukleotid-Lösungen folgende Konzentrationen und wurden bei 20 °C spektroskopisch untersucht:

$$C_{(\text{DNA})} = 2.5 \mu\text{M}$$

$$C_{(\text{NaPi})} = 10 \text{ mM}$$

$$C_{(\text{NaCl})} = 250 \text{ mM}$$

- **UV/Vis-Absorptionsmessungen**

Die UV/Vis-Absorptionsspektren wurden in einem *Cary 100 Bio* der Firma *Varian* mit temperierbarem Küvettenhalter aufgenommen. Die Spektren wurden gegen die UV/Vis-Absorption des Lösungsmittels basislinienkorrigiert. Folgende Messparameter wurden verwendet: SBW: 2.0 nm, Average time 0.1 s, Data interval 1.0, Light source change over 350 nm.

- **Schmelztemperaturmessungen**

Die Schmelztemperaturmessungen erfolgten analog den UV/Vis-Absorptionsmessungen über einen Temperaturbereich von 20°C – 90°C. Die Temperatur am Start- bzw. Endpunkt wurde jeweils 10 min konstant gehalten. Die Heiz- bzw. Kühlrate betrug 0.7°C/min, Die Messdaten wurden in 0.5°C Abständen erfasst.

- **Fluoreszenzmessungen**

Die Fluoreszenzmessungen wurden an einem *Fluoromax-3 Fluorimeter* von *Jobin-Yvon* mit einem Peltiere-Element *LFI-3751* zur Temperaturregelung von *Wavelength Electronics* durchgeführt. Die Spektren wurden gegen die

Ramanstreuung des Lösungsmittels basislinienkorrigiert. Folgende Messparameter wurden verwendet: Increment: 1.0 nm, Increment time: 0.2 s.

- **Temperaturabhängige Fluoreszenzmessungen**

Die Fluoreszenzspektren wurden über einen Temperaturbereich von 20°C– 90°C aufgenommen. Vor jeder Messung wurde die Temperatur mit einer Toleranz von 1.0°C 5 min konstant gehalten.

- **Fluoreszenzquantenausbeuten**

Die Bestimmung der Fluoreszenzquantenausbeute erfolgte für die BodU-modifizierten Oligonukleotide mit einer basischen Fluoresceinlösung. Die Quantenausbeute von Fluorescein beträgt nach der *Weber-Teale* Methode 92 %.^[397] Alle anderen angegebenen Quantenausbeuten wurden in der Arbeitsgruppe von Prof. *Yersin* direkt durch „*single photon counting*“ bestimmt.

- **Zeitaufgelöste Transientenabsorptionsmessungen**

Zeitaufgelöste Absorptionsmessungen wurden von der Arbeitsgruppe von *Fiebig* durchgeführt.

- **Spektroelektrochemie, Radikalspektroskopie (SEC)**

Für die SEC-Messungen wurde eine spezielle Zelle aus Calciumfluorid-Platten mit einer Drei-Elektroden-Anordnung verwendet. Als Arbeitselektrode diente ein Platinnetz. Die entsprechende Gegen- bzw. Referenzelektrode bestand aus Platin bzw. Silber. Die Messungen wurden in einem *Varian Cary 50* mit speziellem Probenhalter in trockenen Lösungsmitteln und mit TBAHFP als Leitsalz durchgeführt. Es wurden die Absorptionsänderungen bei steigendem Potential aufgezeichnet. Das Potential wurde durch einen Potentiostaten (*Cubepot*) erzeugt, der mit der Software *Mastercontrol* angesteuert werden konnte. Die Potentiale wurden nicht gegen einen internen Standard kalibriert und sind daher keine Absolutwerte.

Cyclovoltammetrie (CV)

CV-Messungen wurden mit einer Drei-Elektroden-Anordnung aus Gegenelektrode, Pseudo-Referenzelektrode und Arbeitselektrode durchgeführt. Die Elektroden bestanden aus Platin. Das Potential wurde durch einen Potentiostaten (*Cubepot*) erzeugt, der mit der Software *Mastercontrol* angesteuert werden konnte. Vor jeder Messung wurden die Zelle und das verwendete Lösungsmittel mit Argon gespült. Die Messungen wurden in trockenen DMF und um eine ausreichende Leitfähigkeit zu gewährleisten und Migrationsströme zu verhindern mit Tetrabutylammoniumhexafluorophosphat (TBAHFP) als Leitsalz durchgeführt. Die Angabe der Potentialwerte erfolgte gegen Ferrocen (Fc^+ / Fc) als internem Standard. Die erhaltenen Potentiale wurden mit einem Umrechnungsfaktor von + 0.63 V auf Potentiale gegen die Normalwasserstoffelektrode (NHE) umgerechnet.^[340]

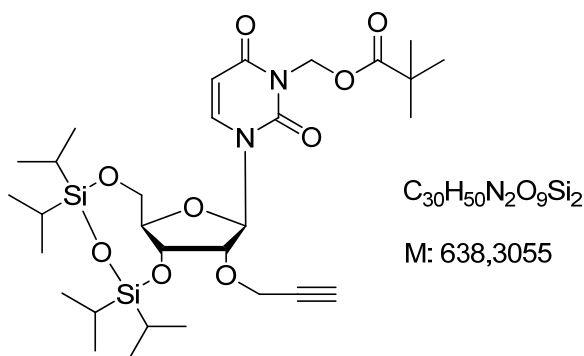
9.2 Synthesen

Aufgrund der Vielzahl von Synthesestufen werden alle Synthesen, die unter Literaturbedingungen durchgeführt wurden hier nicht gesondert aufgeführt. Die entsprechende Literaturangabe kann dem jeweiligen Abschnitt des Syntheseteils entnommen werden. Für Verbindungen, die bereits literaturbekannt sind, aber nach deutlich geänderten Synthesevorschriften dargestellt wurden, werden keine spektroskopischen Daten angegeben, sondern auf die entsprechende Literatur verwiesen.

9.2.1 Darstellung des alkynylmodifizierten Uridins 6

Die Synthese des alkynylmodifizierten Uridins **6** wurde größtenteils nach Literaturbedingungen durchgeführt.^[196, 398] Lediglich der Schlüsselschritt bei der Synthese von **3** wurde überarbeitet um die Ausbeuten deutlich zu erhöhen.

(3) 3',5'-O-(Tetraisopropylidisiloxan-1,3-diyl)-N³-pivaloyloxymethyl-2'-O-propargyluridin



2 (1.04 g, 1.7 mmol) wurde in 10 mL abs. MeCN gelöst und im Eisbad auf 0°C gekühlt. Es wurden nacheinander Phosphazenen-Base P₁-t-Bu (0.41 mL, 2.5 mmol) und Propargylbromid (0.22 mL, 2.5 mmol) zugegeben. Die Lösung wurde 15 min bei 0°C und 90 min bei RT gerührt. Anschließend wurde die Reaktionsmischung mit 50 mL (0.5 M) Phosphatpuffer versetzt und dreimal mit je 100 mL Hexan extrahiert. Die organische Phase wurde mit 75 mL gesättigter NaCl-Lösung gewaschen und über Na₂SO₄ getrocknet. Das Lösungsmittel wurde im Vakuum entfernt und das Rohprodukt am HV getrocknet. Die Reinigung des Rohproduktes erfolgte über FC (CH₂Cl₂/MeOH 100:1). Das Produkt **3** (770 mg, 1.2 mmol, 72 % d. Th.) wurde als farbloser schaumiger Feststoff erhalten.

Die Analysedaten stimmen mit denen aus der Literatur überein.^[196]

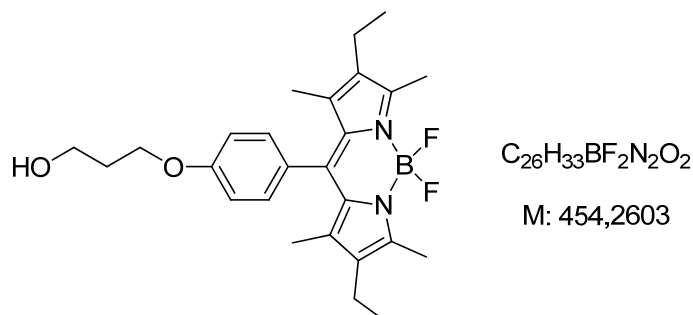
9.2.2 Darstellung des Bodipy-Basensurrogates

Die Synthese für 4-(3-Hydroxypropoxy)benzaldehyd (**7**) erfolgte in einer Stufe nach Literaturbedingungen.^[226] Die Synthese des acyclischen Linkers **L** erfolgte in drei Stufen nach Literaturbedingungen und wurde von Daniel Lachmann durchgeführt.^[224, 227]

Die beschriebenen Synthesen wurden mit der (S)-Konfiguration des Linkers durchgeführt. Die Synthesevorschriften der Verbindungen mit (R)-Konfiguration

entsprechen sowohl in der Durchführung, als auch in den Ausbeuten und der Analytik den beschriebenen.

(8) 2,6-Diethyl-4,4-difluoro-1,3,5,7-tetramethyl-8-(4-(3-hydroxypropoxy)phenyl)-4-bora-3a,4a-diaza-s-indacen



4-(3-Hydroxypropoxy)benzaldehyd (**7**) (2.42 g, 13.2 mmol) wurde unter Argon-Atmosphäre in 120 mL abs. CH_2Cl_2 gelöst. Nach Zugabe von 3-Ethyl-2,4-dimethylpyrrol (4.06 g, 33.3 mmol, 2.5 eq) wurde die Reaktionsmischung 15 min gerührt. Anschließend wurden 0.2 mL Trifluoressigsäure zugegeben und über Nacht bei RT gerührt. Es wurde p-Chloranil (3.25 g, 13.2 mmol) zugegeben und die Mischung wurde weitere 6 h gerührt. Zur jetzt tief roten Lösung wurden NEt_3 (31.3 mL, 224 mmol) und 30 min später $BF_3 \cdot OEt_2$ (31.5 mL, 251 mmol) gegeben. Die Mischung wurde weitere 6 h gerührt. Die Reaktionslösung wurde dreimal mit je 50 mL Wasser extrahiert. Die organische Phase wurde über Na_2SO_4 getrocknet und das Lösungsmittel wurde entfernt. Nach Aufreinigung über FC (CH_2Cl_2 /Aceton 20:1) wurde **8** (3.79 g, 8.4 mmol, 64 % d. Th.) als roter Feststoff erhalten.

1H NMR (CD_2Cl_2 , 600 MHz) δ 7.18 (d, 2H, $J = 8.7$ Hz), 7.03 (d, 2H, $J = 8.7$ Hz), 4.17 (t, 2H, $J = 6.1$ Hz), 3.85 (t, 2H, $J = 5.9$ Hz), 2.49 (s, 6H), 2.33 (q, 4H, $J = 7.6$ Hz), 2.06 (tt, 2H, $J_1 = 6.1$ Hz, $J_2 = 5.9$ Hz), 1.36 (s, 6H), 0.99 (t, 6H, $J = 7.6$ Hz);

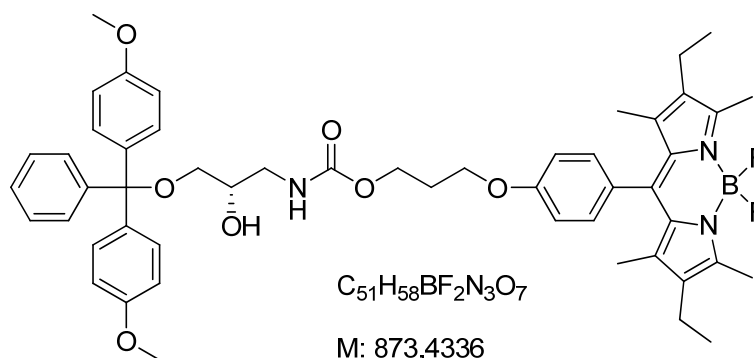
^{13}C NMR (CD_2Cl_2 , 150 MHz) δ 159.9, 153.8, 141.0, 139.1, 133.2, 131.5, 129.9, 128.1, 115.4, 66.0, 60.3, 32.5, 17.3, 14.8, 12.6, 12.0

^{19}F NMR (CD_2Cl_2 , 300 MHz) δ -145.4 (d), -145.7 (d);

EI-MS m/z (%): 454.3 (100) [M^{++}], 439.2 (10) [$M^{++}-CH_3^+$]

HR-EI-MS m/z (ber.) = 454.2603 [M^{++}]; m/z (gef.) = 454.2610 [M^{++}]

(9) 2,6-Diethyl-4,4-difluoro-1,3,5,7-tetramethyl-8-(4-(3-(3-(bis(4-methoxyphenyl)(phenyl)methoxy)-(2*S*)-hydroxypropylcarbamoyloxy)propyloxy)phenyl)-4-bora-3a,4a-diaza-s-indacen



Zu einer Lösung von **8** (100 mg, 0.22 mmol) in 5 mL abs. DMF wurde 1,1'-Carbonyldiimidazol (54 mg, 0.33 mmol) gegeben und die Reaktionsmischung wurde unter Argon-Atmosphäre 6 h bei RT gerührt. Anschließend wurde DMT-geschütztes (S)-3-amino-1,2-propanediol (**L**) (173 mg, 0.44 mmol) zugegeben und die Lösung wurde über Nacht bei 35°C gerührt. Das Lösungsmittel wurde entfernt und das Produkt wurde durch FC (CH₂Cl₂/Acetone 15:1) gereinigt. **9** (152 mg, 0.17 mmol) wurde als roter Schaum erhalten (79 % d. Th.).

¹H NMR (CD₂Cl₂, 400 MHz) δ 7.43 (m, 2H), 7.35-7.20 (m, 7H), 7.18 (d, 2H, J = 8.5 Hz), 7.01 (d, 2H, J = 8.5 Hz), 6.85 (m, 4H), 5.03 (m, 1H), 4.24 (t, 2H, J = 6.3 Hz), 4.09 (t, 2H, J = 6.3 Hz), 3.85 (m, 1H), 3.78 (s, 6H), 3.37 (m, 1H), 3.20-3.10 (m, 3H), 2.49 (s, 6H), 2.32 (q, 4H, J = 7.7 Hz), 2.12 (tt, 2H, J_1 = 6.3 Hz, J_2 = 6.3 Hz), 1.36 (s, 6H), 0.99 (t, 6H, J = 7.7 Hz);

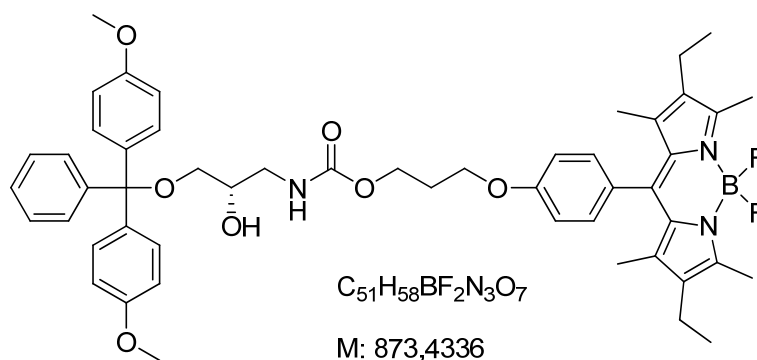
¹³C NMR (CD₂Cl₂, 150 MHz) δ 159.8, 159.1, 157.5, 153.8, 145.3, 141.0, 139.1, 136.2, 133.2, 131.5, 130.4, 129.9, 128.4, 128.3, 128.2, 128.1, 127.2, 115.4, 113.5, 86.6, 70.7, 65.4, 65.1, 62.1, 56.6, 44.6, 29.4, 17.4, 14.8, 12.6, 12.0;

¹⁹F NMR (CD₂Cl₂, 300 MHz) δ -145.4 (d), -145.7 (d);

ESI-MS m/z (%): 303.1 (100) [DMT⁺], 874.5 (10) [M-H⁺], 891.5 (80) [M-NH₄⁺]

HR-EI-MS m/z (ber.) = 873.4336 [M⁺]; m/z (gef.) = 873.4327 [M⁺]

(10) 2,6-Diethyl-4,4-difluoro-1,3,5,7-tetramethyl-8-(4-(3-(3-(bis(4-methoxyphenyl)(phenyl)methoxy)-(2S)-((2-cyanoethoxy)(diisopropylamino)phosphinooxy)propylcarbamoyloxy)propyloxy)phenyl)-4-bora-3a,4a-diaza-s-indacen



6 (190 mg, 0.21 mmol) wurde unter Argon-Atmosphäre in 3 mL abs. CH₂Cl₂ gelöst. Es wurden DIPEA (73 µL, 0.42 mmol) und 2-Cyanoethyl-*N,N*-diisopropylchlorophosphoramidit (85 µL, 0.38 mmol) zugegeben und 2 h bei RT gerührt. Die organische Phase wurde mit gesättigter aq. NaHCO₃ gewaschen und über Na₂SO₄ getrocknet. Nach Entfernen des Lösungsmittels wurde **10** quantitativ als roter Feststoff erhalten.

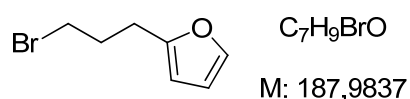
³¹P NMR (CDCl₃, 121MHz) δ 150.1, 149.8;

9.2.3 Darstellung der 2'-OH-modifizierten Cytidine 19, 20 und 21

Die Synthese von *N*⁴-Benzoylcytidin (**11**) wurde nach Literaturbedingungen durchgeführt.^[243]

(22b) 2-(3-Bromopropyl)furan

Die Synthese von 2-(3-Bromopropyl)furan wurde analog zu einer Vorschrift von *Barancelli* durchgeführt.^[244]

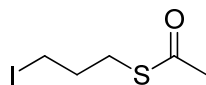


40 mL abs. THF wurden unter Argon-Atmosphäre auf -20°C gekühlt und mit n-Butyllithium (15 mL einer 1.6 M Lsg. in Hexan, 24 mmol) versetzt. Anschließend wurde frisch destilliertes Furan (1.7 mL, 24 mmol) zugegeben und die Mischung wurde 4 h bei -20°C gerührt. Es wurde tropfenweise 1,3-Dibromopropan (2.0 mL, 20 mmol) zugegeben und die Mischung wurde über Nacht bei RT gerührt. Die Reaktion wurde durch Zugabe von gesättigter aq. NH₄Cl-Lösung (20 mL) abgebrochen und die Reaktionsmischung wurde dreimal mit je 40 mL Ethylacetat extrahiert. Die gesammelten organischen Phasen wurden über Na₂SO₄ getrocknet. Das Lösungsmittel wurde entfernt und das Rohprodukt wurde über FC (Hexan) gereinigt. Es wurde ein leicht gelbliches Öl (2.74g, 14.6 mmol, 73% d. Th.) erhalten.

¹H NMR (CDCl₃, 300 MHz) δ 7.31(m, 1H), 6.29 (m, 1H), 6.05 (m, 1H), 3.42 (t, 2H, *J* = 6.4 Hz), 2.81 (t, 2H, *J* = 7.2 Hz), 2.19 (tt, 2H, *J*₁ = 6.4 Hz, *J*₂ = 7.2 Hz);

¹³C NMR (CDCl₃, 75 MHz) δ 143.1, 140.2, 109.1, 104.7, 31.8, 30.0, 25.3;

EI-MS *m/z* (%): 81.1 (100) [(C₅H₅O)⁺], 188.1 (20) [M⁺]

(22c) 3-IodopropylthioacetatC₅H₉IOS

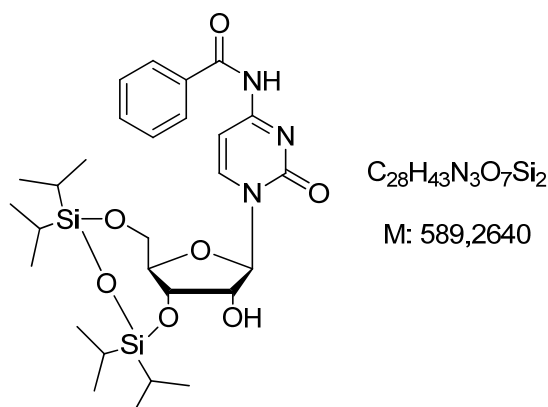
M: 243,9419

Zu einer Lösung von NaI (10.0 g, 66.7 mmol) in Aceton (70 mL) wurde bei RT unter N₂-Atmosphäre 3-Chloropropylthioacetat zugetropft (4.1 mL, 31.7 mmol). Die Reaktionsmischung wurde unter Lichtausschluss über Nacht bei 60°C gerührt. Das Lösungsmittel wurde entfernt und der Rückstand wurde mit 50 mL Wasser versetzt und dreimal mit je 100 mL Diethylether extrahiert. Die gesammelten organischen Phasen wurden über Na₂SO₄ getrocknet. Das Lösungsmittel wurde entfernt und das Produkt wurde ohne weitere Aufreinigung als gelbes Öl erhalten (7.2 g, 29.5 mmol, 93% d. Th.).

¹H NMR (CDCl₃, 300 MHz) δ 3.15 (t, 2H, *J* = 6.9 Hz), 2.89 (t, 2H, *J* = 7.0 Hz), 2.28 (s, 3H), 2.02 (tt, 2H, *J*₁ = *J*₂ = 6.9 Hz);

¹³C NMR (CDCl₃, 75 MHz) δ 195.4, 33.0, 30.7, 29.8, 4.4;

EI-MS *m/z* (%): 43.1 (100) [CH₃CO⁺], 244.0 (10) [M^{•+}]

(12) 3',5'-O-(Tetraisopropylidisiloxan-1,3-diyl)- *N*⁴-benzoylcytidin

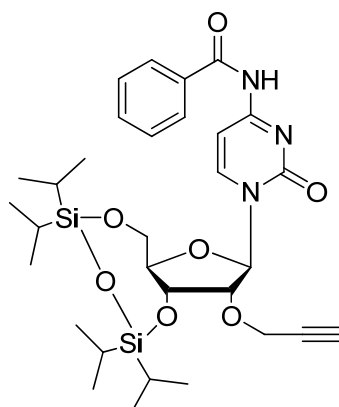
*N*⁴-Benzoylcytidin (3.99 g, 11.5 mmol) wurde in 50 mL abs. Pyridin gelöst und tropfenweise mit 1,3-Dichloro-1,1,3,3-diisopropylidisiloxan (4.05 mL, 12.7 mmol) versetzt. Die Lösung wurde 6 h bei RT gerührt und das Lösungsmittel wurde entfernt. Der Rückstand wurde in 100 mL Ethylacetat gelöst und mit gesättigter aq. NaHCO₃-Lösung extrahiert. Die wässrige Phase wurde mit weiteren 50 mL Ethylacetat gewaschen. Die organischen Phasen wurden vereinigt und über Na₂SO₄ getrocknet. Das Lösungsmittel wurde entfernt und das Produkt durch FC (CH₂Cl₂ / Aceton 6:1) gereinigt. Es wurde ein farbloser Feststoff (6.17 g, 10.5 mmol, 91% d. Th.) erhalten.

Die Analysedaten stimmen mit denen aus der Literatur überein.^[242]

Allgemeine Synthesevorschrift für 13, 14 und 15

12 (1.02 g, 1.7 mmol) wurde in abs. MeCN gelöst und auf 0°C gekühlt. Es wurden nacheinander 1.5 eq. Phosphazenen-Base P₁-tBu (0.65 mL, 2.5 mmol) und 1.5 eq. (2.5 mmol) des entsprechenden Alkylhalogenids (**22a**, **22b**, **22c**) zugegeben. Die Lösung wurde 15 min bei 0°C und anschließend 2 h bei RT gerührt. Die Reaktionsmischung wurde mit 50 mL 0.5 M Phosphatpuffer versetzt und dreimal mit je 50 mL Diethylether extrahiert. Die gesammelten organischen Phasen wurden über Na₂SO₄ getrocknet und das Lösungsmittel wurde entfernt. Die Reinigung des Rohproduktes erfolgte über FC (CH₂Cl₂/Aceton 100:1). Es wurde ein schaumiger farbloser Feststoff erhalten.

(13) 3',5'-O-(Tetraisopropylidisiloxan-1,3-diyl)-2'-O-propargyl-*N*⁴-benzoylcytidin



$C_{31}H_{45}N_3O_7Si_2$

M: 627,2796

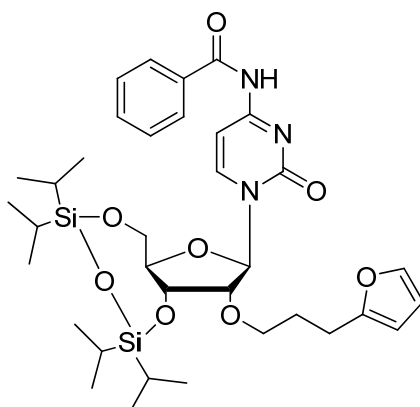
Ausbeute: 69 % d. Th. (735 mg, 1.2 mmol)

1H NMR ($CDCl_3$, 300 MHz) δ 8.15-8.18 (m, 2H), 7.37-7.51 (m, 4H), 6.44 (d, 1H, $J = 8.2$ Hz), 5.76 (s, 1H), 4.90 (d, 2H, $J = 2.5$ Hz), 4.31 (dd, 1H, $J_1 = 8.5$ Hz, $J_2 = 4.9$ Hz), 4.09-4.16 (m, 2H), 4.04 (td, 1H, $J_1 = 8.7$ Hz, $J_2 = 2.3$ Hz), 3.95 (dd, 1H, $J_1 = 13.2$ Hz, $J_2 = 2.8$ Hz), 2.85 (br s, 1H), 0.95-1.05 (m, 28H);

^{13}C NMR ($CDCl_3$, 75 MHz) δ 177.1, 154.3, 149.2, 136.0, 135.8, 132.6, 130.0, 128.2, 98.0, 91.1, 82.0, 78.1, 75.3, 70.9, 69.2, 60.2, 32.2, 17.4, 17.3, 17.2, 17.1, 17.0, 16.9, 16.8, 13.4, 12.9, 12.9, 12.5;

ESI-MS m/z (%): 628.3 (100) $[M-H]^+$, 1255.8 (15) $[2M-H]^+$

(14) 3',5'-O-(Tetraisopropyldisiloxan-1,3-diyl)-2'-O-(3-(furan-2-yl)propyl)-N⁴-benzoylcytidin



C₃₅H₅₁N₃O₈Si₂

M: 697,3215

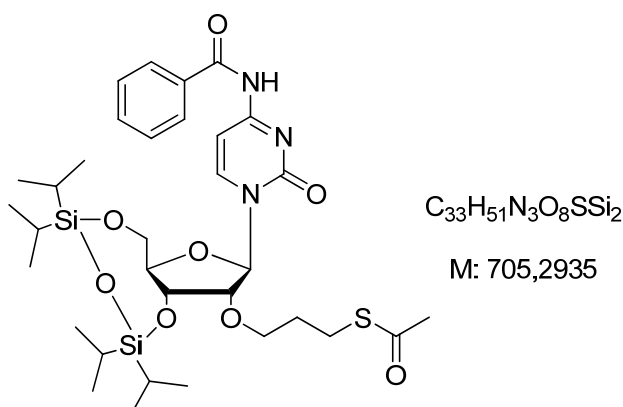
Ausbeute: 61 % d. Th. (720 mg, 1.0 mmol)

¹H NMR (CDCl₃, 300 MHz) δ 8.06 (m, 2H), 7.48 (m, 1H), 7.35 – 7.41 (m, 3H), 7.22 (m, 1H), 6.47 (d, 1H, *J* = 8.2 Hz), 6.20 (m, 1H), 6.02 (m, 1H), 5.72 (s, 1H), 4.31 (dd, 1H, *J*₁ = 8.5 Hz, *J*₂ = 4.9 Hz), 4.22 (m, 2H), 4.13 (dd, 1H, *J*₁ = 13.1 Hz, *J*₂ = 2.2 Hz), 4.00 – 4.09 (m, 2H), 3.95 (dd, 1H, *J*₁ = 12.9 Hz, *J*₂ = 2.7 Hz), 2.73 (t, 2H, *J* = 7.4 Hz), 2.11 (tt, 2H, *J*₁ = *J*₂ = 7.5 Hz), 0.95-1.05 (m, 28H);

¹³C NMR (CDCl₃, 75 MHz) δ 177.1, 156.0, 155.0, 141.0, 136.3, 135.9, 132.3, 129.7, 128.2, 110.1, 105.1, 98.2, 91.2, 81.9, 75.4, 69.2, 60.3, 42.9, 25.7, 25.1, 17.4, 17.4, 17.3, 17.1, 17.0, 16.9, 16.9, 13.4, 13.0, 12.9, 12.5;

ESI-MS *m/z* (%): 698.3 (100) [M-H⁺], 1395.9 (10) [2M-H⁺]

(15) 3',5'-O-(Tetraisopropylidisiloxan-1,3-diyl)-2'-O-(3-thioacetylpropyl)-N⁴-benzoylcytidin



Ausbeute: 63 % d. Th. (750 mg, 1.1 mmol)

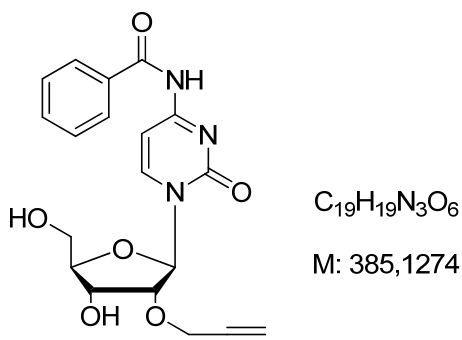
¹H NMR (CDCl₃, 300 MHz) δ 8.14 (m, 1H), 8.12 (m, 1H), 7.53 (m, 1H), 7.41 – 7.47 (m, 3H), 6.51 (d, 1H, $J = 8.0$ Hz), 5.77 (s, 1H), 4.36 (dd, 1H, $J_1 = 8.8$ Hz, $J_2 = 4.9$ Hz), 4.26 (t, 2H, $J = 7.3$ Hz), 4.18 (dd, 1H, $J_1 = 13.2$ Hz, $J_2 = 1.9$ Hz), 4.12 (d, 1H, $J = 4.9$ Hz), 4.07 (td, 1H, $J_1 = 8.8$ Hz, $J_2 = 2.3$ Hz), 3.99 (dd, 1H, $J_1 = 13.2$ Hz, $J_2 = 2.7$ Hz), 2.98 (t, 2H, $J = 7.0$ Hz), 2.29 (s, 3H), 2.09 (tt, 2H, $J = 7.3$ Hz, $J_2 = 7.1$ Hz), 1.01-1.09 (m, 28H);

¹³C NMR (CDCl₃, 75 MHz) δ 195.5, 177.1, 156.0, 149.8, 136.2, 136.0, 132.4, 129.8, 128.2, 98.2, 91.2, 81.9, 75.4, 69.2, 60.3, 42.2, 30.6, 27.1, 26.8, 17.4, 17.4, 17.3, 17.1, 17.0, 16.9, 16.8, 13.4, 12.9, 12.9, 12.5;

ESI-MS m/z (%): 706.3 (100) [M-H⁺]

Allgemeine Synthesevorschrift für 16, 17 und 18

13 (500 mg, 0.80 mmol), **14** (500 mg, 0.72 mmol) bzw. **15** (500 mg, 0.71 mmol) wurde in abs. THF gelöst und mit 5 eq. $\text{NEt}_3 \cdot 3\text{HF}$ versetzt. Die Reaktionsmischung wurde über Nacht bei RT gerührt. Die Reaktionsmischung wurde mit 50 mL Ethylacetat versetzt und mit 50 mL 1M aq. Na_2CO_3 -Lösung extrahiert. Die wässrige Phase wurde mit weiteren 50 mL Ethylacetat gewaschen. Die organischen Phasen wurden vereinigt und über Na_2SO_4 getrocknet. Nach Entfernen des Lösungsmittels wurde das Rohprodukt durch FC ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 100:7) gereinigt. Es wurde ein farbloser schaumiger Feststoff erhalten.

(16) 2'-O-propargyl-*N*⁴-benzoylcytidin

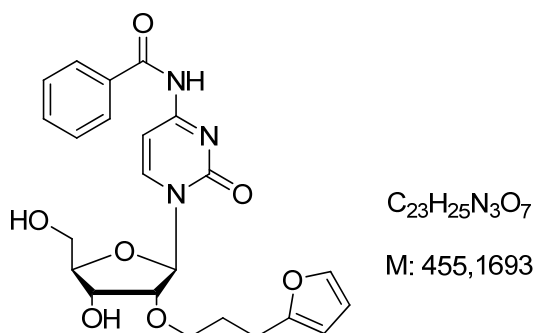
Ausbeute: 81 % d. Th. (250 mg, 0.65 mmol)

^1H NMR (MeOD, 300 MHz) δ 8.18 (m, 1H), 8.16 (m, 1H), 7.92 (d, 1H, $J = 8.2$ Hz), 7.56 (m, 1H), 7.45 (m, 2H), 6.39 (d, 1H, $J = 8.0$ Hz), 5.94 (d, 1H, $J = 4.1$ Hz), 4.92 (d, 2H, $J = 2.5$ Hz), 4.12 – 4.21 (m, 2H), 4.01 (td, 1H, $J_1 = 4.9$ Hz, $J_2 = 2.7$ Hz), 3.85 (dd, 1H, $J_1 = 12.1$ Hz, $J_2 = 2.7$ Hz), 3.73 (dd, 1H, $J_1 = 12.1$ Hz, $J_2 = 3.3$ Hz), 2.66 (t, 1H, $J = 2.5$ Hz)

^{13}C NMR (MeOD, 75 MHz) δ 179.3, 156.2, 151.2, 139.2, 137.0, 134.0, 131.0, 129.4, 98.6, 91.8, 86.4, 79.4, 75.9, 72.2, 71.1, 62.1, 33.3;

ESI-MS m/z (%): 386.0 (100) $[\text{M}-\text{H}^+]$, 771.3 (10) $[2\text{M}-\text{H}^+]$

(17) 2'-O-(3-(furan-2-yl)propyl)-N⁴-benzoylcytidin



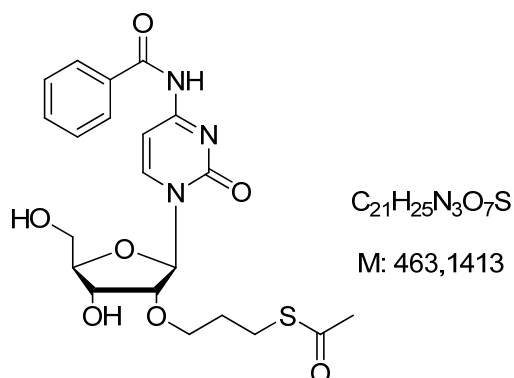
Ausbeute: 79 % d. Th. (260 mg, 0.57 mmol)

¹H NMR (MeOD, 300 MHz) δ 8.07 (m, 1H), 8.04 (m, 1H), 7.91 (d, 1H, J = 8.2 Hz), 7.54 (m, 1H), 7.44 (m, 2H), 7.30 (m, 1H), 6.42 (d, 1H, J = 8.2 Hz), 6.24 (m, 1H), 6.08 (m, 1H), 5.93 (d, 1H, J = 3.6 Hz), 4.25 (t, 2H, J = 7.5 Hz), 4.12 – 4.19 (m, 2H), 4.01 (td, 1H, J_1 = 4.9 Hz, J_2 = 2.7 Hz), 3.86 (dd, 1H, J_1 = 12.1 Hz, J_2 = 2.7 Hz), 3.73 (dd, 1H, J_1 = 12.1 Hz, J_2 = 3.3 Hz), 2.76 (t, 2H, J = 7.3 Hz), 2.06 – 2.17 (m, 2H);

¹³C NMR (MeOD, 75 MHz) δ 179.3, 158.1, 156.4, 151.8, 142.3, 139.1, 137.4, 133.7, 130.8, 129.4, 111.2, 106.2, 98.9, 91.9, 86.2, 76.0, 71.0, 62.0, 44.0, 26.5, 26.4;

ESI-MS m/z (%): 456.0 (100) $[M-H^+]$, 911.5 (10) $[2M-H^+]$

(18) 2'-O-(3-thioacetylpropyl)-N⁴-benzoylcytidin



Ausbeute: 72 % d. Th. (235 mg, 0.51 mmol)

^1H NMR (MeOD, 300 MHz) δ 8.11 (m, 1H), 8.09 (m, 1H), 7.93 (d, 1H, $J = 8.2$ Hz), 7.54 (m, 1H), 7.44 (m, 2H), 6.44 (d, 1H, $J = 8.2$ Hz), 5.92 (d, 1H, $J = 3.6$ Hz), 4.24 (t, 2H, $J = 7.1$ Hz), 4.13 – 4.21 (m, 2H), 4.02 (td, 1H, $J_1 = 5.2$ Hz, $J_2 = 2.7$ Hz), 3.86 (dd, 1H, $J_1 = 12.3$ Hz, $J_2 = 2.7$ Hz), 3.74 (dd, 1H, $J_1 = 12.3$ Hz, $J_2 = 3.0$ Hz), 2.96 (t, 2H, $J = 7.1$ Hz), 2.26 (s, 3H), 2.03 (tt, 2H, $J_1 = J_2 = 7.1$ Hz);

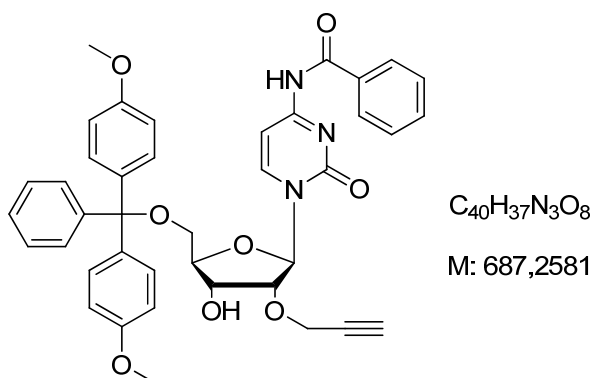
^{13}C NMR (MeOD, 75 MHz) δ 197.4, 179.2, 158.1, 151.8, 139.2, 137.4, 133.8, 130.8, 129.5, 98.9, 91.9, 86.2, 76.0, 71.0, 62.0, 43.4, 30.6, 28.4, 27.7;

ESI-MS m/z (%): 464.0 (100) $[\text{M}-\text{H}^+]$, 927.4 (10) $[2\text{M}-\text{H}^+]$

Allgemeine Synthesevorschrift für **19**, **20** und **21**

16 (300 mg, 0.78 mmol), **17** (200 mg, 0.44 mmol) bzw. **18** (200 mg, 0.43 mmol) wurde in 5 mL abs. Pyridin gelöst und mit 1.3 eq 4,4'-Dimethoxytritylchlorid (DMT-Cl) versetzt. Die Reaktionsmischung wurde über Nacht bei RT gerührt. Die Reaktion wurde durch Zugabe von MeOH abgebrochen und das Lösungsmittel wurde entfernt. Der Rückstand wurde in 50 mL Ethylacetat aufgenommen und mit 50 mL 1M aq. Na_2CO_3 -Lösung extrahiert. Die wässrige Phase wurde mit weiteren 50 mL Ethylacetat gewaschen. Die organischen Phasen wurden vereinigt und über Na_2SO_4 getrocknet. Nach Entfernen der Lösungsmittels wurde das Produkt durch FC ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{Aceton}$ 10:1) gereinigt. Es wurde ein farbloser schaumiger Feststoff erhalten.

(19) 5'-O-(bis(4-Methoxyphenyl)(phenyl)methoxy)-2'-O-propargyl- N^4 -benzoylcytidin



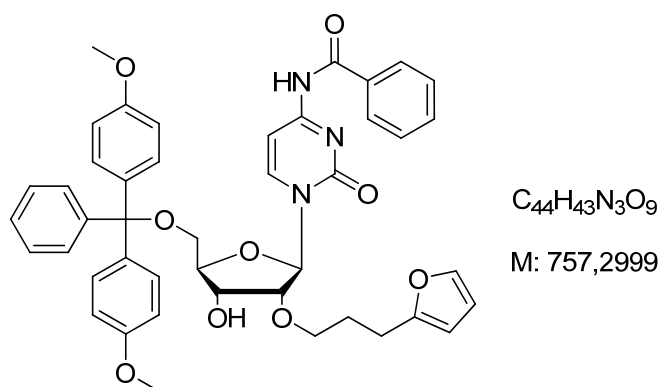
Ausbeute: 87 % d. Th. (470 mg, 0.68 mmol)

¹H NMR (CD₂Cl₂, 300 MHz) δ 8.17 (m, 1H), 8.14 (m, 1H), 7.68 (d, 1H, *J* = 8.2 Hz), 7.55 (m, 1H), 7.45 (m, 2H), 7.19 – 7.39 (m, 9H), 6.83 (m, 4H), 6.17 (d, 1H, *J* = 8.2 Hz), 5.86 (d, 1H, *J* = 3.0 Hz), 4.92 (d, 2H, *J* = 2.5 Hz), 4.38 (t, 1H, *J* = 5.2 Hz), 4.30 (m, 1H), 4.01 (td, 1H, *J*₁ = 5.2 Hz, *J*₂ = 2.9 Hz), 3.76 (s, 6H), 3.46 (dd, 1H, *J*₁ = 11.0 Hz, *J*₂ = 2.7 Hz), 3.40 (dd, 1H, *J*₁ = 11.0 Hz, *J*₂ = 3.0), 2.31 (t, 1H, *J* = 2.3 Hz)

¹³C NMR (CD₂Cl₂, 75 MHz) δ 176.1, 158.0, 153.3, 149.4, 143.5, 135.4, 135.0, 134.6, 134.5, 131.8, 129.3, 129.2, 129.0, 127.4, 127.3, 127.2, 126.3, 112.4, 97.2, 90.8, 86.2, 83.4, 77.4, 75.3, 69.9, 69.6, 61.4, 54.4, 31.4;

ESI-MS *m/z* (%): 688.2 (100) [M-H⁺], 1375.9 (15) [2M-H⁺]

(20) 5'-O-(bis(4-Methoxyphenyl)(phenyl)methoxy)-2'-O-(3-(furan-2-yl)propyl)-N⁴-benzoylcytidin



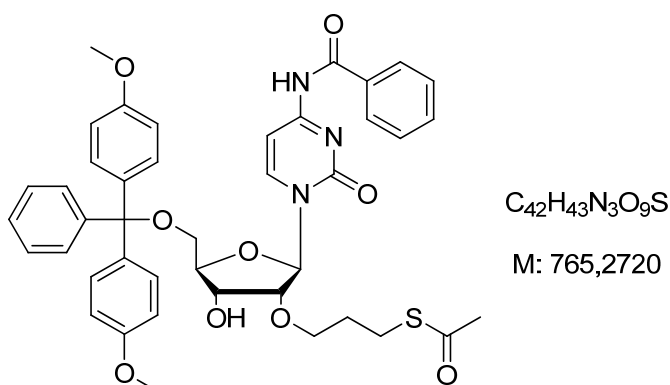
Ausbeute: 83 % d. Th. (270 mg, 0.36 mmol)

¹H NMR (CD₂Cl₂, 300 MHz) δ 8.08 (m, 1H), 8.06 (m, 1H), 7.64 (d, 1H, *J* = 8.2 Hz), 7.54 (m, 1H), 7.44 (m, 2H), 7.37 (m, 2H), 7.20 – 7.30 (m, 8H), 6.83 (m, 4H), 6.27 (m, 2H), 6.09 (d, 1H, *J* = 3.0 Hz), 5.82 (d, 1H, *J* = 3.0 Hz), 4.35 (t, 1H, *J* = 5.3 Hz), 4.19 – 4.27 (m, 4H), 3.76 (s, 6H), 3.45 (dd, 1H, *J*₁ = 11.0 Hz, *J*₂ = 2.7 Hz), 3.37 (dd, 1H, *J*₁ = 11.0 Hz, *J*₂ = 3.5 Hz), 2.77 (t, 2H, *J* = 7.3 Hz), 2.13 (tt, 2H, *J*₁ = *J*₂ = 7.5 Hz);

^{13}C NMR (MeOD, 75 MHz) δ 176.1, 158.0, 155.0, 154.4, 150.1, 143.5, 140.2, 135.6, 135.0, 134.6, 134.5, 131.5, 129.3, 129.2, 128.8, 127.4, 127.3, 127.2, 126.2, 112.4, 109.4, 104.3, 97.4, 90.9, 86.2, 83.6, 75.6, 69.8, 61.5, 54.4, 41.9, 24.8, 24.4;

ESI-MS m/z (%): 758.3 (100) $[\text{M}-\text{H}^+]$

(21) 5'-O-(bis(4-Methoxyphenyl)(phenyl)methoxy)-2'-O-(3-thioacetylpropyl)-*N*⁴-benzoylcytidin



Ausbeute: 83 % d. Th. (270 mg, 0.35 mmol)

^1H NMR (CD_2Cl_2 , 300 MHz) δ 8.12 (m, 1H), 8.09 (m, 1H), 7.67 (d, 1H, $J = 8.2$ Hz), 7.54 (m, 1H), 7.44 (m, 2H), 7.38 (m, 2H), 7.28 (m, 7H), 6.83 (m, 4H), 6.26 (d, 1H, $J = 8.2$ Hz), 5.84 (d, 1H, $J = 3.0$ Hz), 4.37 (t, 1H, $J = 5.2$ Hz), 4.19 – 4.29 (m, 4H), 3.76 (s, 6H), 3.47 (dd, 1H, $J_1 = 11.0$ Hz, $J_2 = 2.5$ Hz), 3.39 (dd, 1H, $J_1 = 11.0$ Hz, $J_2 = 3.3$ Hz), 2.97 (t, 2H, $J = 7.1$ Hz), 2.29 (s, 3H), 2.03 (tt, 2H, $J_1 = J_2 = 7.2$ Hz);

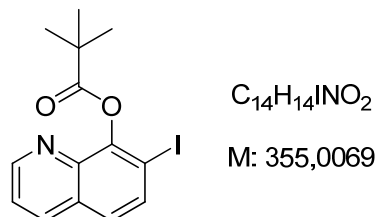
^{13}C NMR (MeOD, 75 MHz) δ 195.0, 176.0, 158.0, 155.0, 150.0, 148.6, 143.5, 135.6, 135.5, 135.2, 134.7, 134.5, 131.5, 129.3, 129.2, 128.8, 128.3, 127.4, 127.3, 127.2, 126.2, 123.2, 112.4, 97.5, 90.7, 86.2, 83.4, 75.2, 69.7, 61.5, 54.4, 41.3, 29.7, 26.4, 25.9;

ESI-MS m/z (%): 766.3 (100) $[\text{M}-\text{H}^+]$

9.2.4 Darstellung des Hydroxychinolin-Basensurrogates

Die Synthese von 8-Hydroxy-7-iodochinolin wurde nach Literaturbedingungen durchgeführt.^[289] Die Darstellung des Glykals **24** erfolgte entweder in zwei Stufen ausgehend von Thymin^[287] oder in vier Stufen ausgehend von Ribose.^[286, 288]

(26) 7-Iodochinolin-8-yl-pivalat



8-Hydroxy-7-iodochinolin (3.04 g, 11.0 mmol) wurde zusammen mit DMAP (127 mg, 1.04 mmol) in abs. Pyridin (50 mL) gelöst. Anschließend wurde unter Eiskühlung langsam Pivaloylchlorid (3.75 mL, 30.4 mmol) zugetropft und die Reaktionsmischung wurde 20 h bei Raumtemperatur gerührt. Das Lösungsmittel wurde entfernt und der Rückstand wurde mit 50 mL ges. NH_4Cl -Lsg. und 50 mL CH_2Cl_2 versetzt. Die organische Phase wurde abgetrennt und die wässrige Phase wurde zweimal mit 50 mL CH_2Cl_2 extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über Na_2SO_4 getrocknet und das Lösungsmittel wurde entfernt. Das Rohprodukt wurde durch FC (Hexan/Diethylether 9:1) gereinigt. Das Produkt **26** (2.1 g, 5.8 mmol, 53% d. Th.) wurde als farbloser Feststoff erhalten.

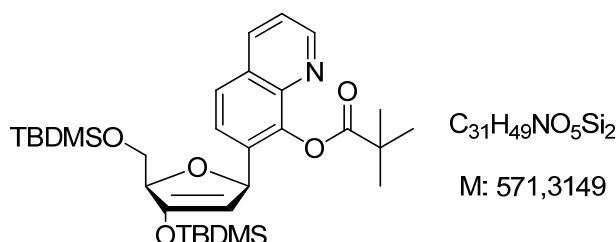
1H NMR (CD_2Cl_2 , 300 MHz) δ 8.85 (dd, 1H, $J_1 = 4.1$ Hz, $J_2 = 1.6$ Hz), 8.17 (dd, 1H, $J_1 = 8.5$ Hz, $J_2 = 1.6$ Hz), 7.90 (d, 1H, $J = 8.8$ Hz), 7.49 (d, 1H, $J = 8.8$ Hz), 7.45 (dd, 1H, $J_1 = 8.3$ Hz, $J_2 = 4.1$ Hz), 1.53 (s, 9H);

^{13}C NMR (CD_2Cl_2 , 75 MHz) δ 175.0, 150.1, 148.5, 140.6, 135.0, 134.4, 128.4, 125.8, 121.4, 90.4, 38.5, 26.4;

EI-MS m/z (%): 355.0 (20) [M^{+}]

HR-ESI-MS m/z (ber.) = 356.0142 [$M-H^{+}$]; m/z (gef.) = 356.0139 [$M-H^{+}$]

(27) 1β-(8-(Pivaloyloxy)chinolin-7-yl)-1,2-dideoxy-2,3-didehydro-3,5-di-O-(tert-butylidimethylsilyl)-D-ribofuranose



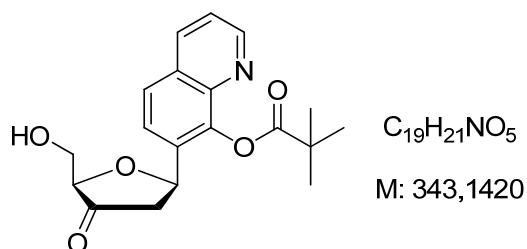
Pd(OAc)₂ (96 mg, 0.43 mmol) und AsPh₃ (265 mg, 0.86 mmol) wurden unter Ar-Atmosphäre in abs. THF (30 mL) gelöst. Die Mischung wurde 30 min unter Rühren bei RT mit Argon gespült. Anschließend wurden 7-Iodochinolin-8-yl-pivalat **26** (1.34 g, 3.8 mmol), eine Lösung des zweifach TBDMS-geschützten Glykals **24** (1.01 g, 2.9 mmol) in abs. THF (20mL) und abs. NEt₃ (0.53 mL, 3.8 mmol) zugegeben. Die Reaktionsmischung wurde über Nacht bei 60°C gerührt. Nach Abkühlen der Reaktionsmischung wurde das Lösungsmittel entfernt das Rohprodukt über FC (Hexan/Diethylether 9:1) gereinigt. Das Produkt **27** (1.21 g, 2.1 mmol, 73% d. Th.) wurde als gelbliches Öl erhalten.

¹H NMR (CD₂Cl₂, 300 MHz) δ 8.84 (dd, 1H, *J*₁ = 4.1 Hz, *J*₂ = 1.6 Hz), 8.15 (dd, 1H, *J*₁ = 8.2 Hz, *J*₂ = 1.6 Hz), 8.11 (d, 1H, *J* = 8.8 Hz), 7.70 (d, 1H, *J* = 8.8 Hz), 7.40 (dd, 1H, *J*₁ = 8.2 Hz, *J*₂ = 4.1 Hz), 6.13 (br m, 1H), 4.75 (br m, 1H), 4.65 (m, 1H), 4.00 (dd, 1H, *J*₁ = 11.4 Hz, *J*₂ = 2.2 Hz), 3.89 (dd, 1H, *J*₁ = 11.4 Hz, *J*₂ = 3.6 Hz), 1.51 (s, 9H), 0.97 (s, 18H), 0.23 (s, 3H), 0.20 (s, 3H), 0.15 (s, 3H), 0.12 (s, 3H);

¹³C NMR (CD₂Cl₂, 75 MHz) δ 176.2, 150.1, 149.3, 143.0, 140.2, 134.8, 134.5, 127.8, 125.2, 124.2, 120.6, 100.6, 83.4, 77.4, 63.0, 38.4; 30.8, 26.4, 25.0, 24.6, 21.9, 17.7, 17.2, 13.1, -6.0, -6.1, -6.3, -6.4;

ESI-MS *m/z* (%): 572.3 (100) [M-H⁺]

HR-ESI-MS *m/z* (ber.) = 572.3222 [M-H⁺]; *m/z* (gef.) = 572.3223 [M-H⁺]

(28) 1β-(8-(Pivaloyloxy)chinolin-7-yl)-1,2-dideoxy-2,3-didehydro-D-ribofuranose

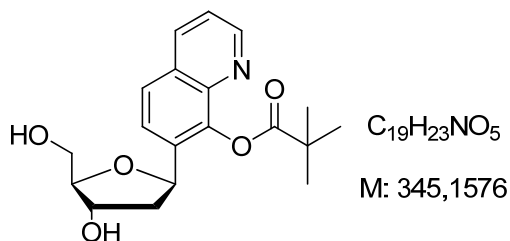
Zu einer Lösung von **27** (500 mg, 0.88 mmol) in abs. THF wurde unter Argon-Atmosphäre bei 0°C $NEt_3 \cdot 3HF$ (400 μ L, 2.46 mmol, 2.8 eq) gegeben. Die Lösung wurde weitere 15 min bei 0°C and anschließend über Nacht bei RT gerührt. Anschließend wurde die Reaktionsmischung direkt mittels FC (CH_2Cl_2 / Aceton 2:1) gereinigt. Das Produkt **28** (260 mg, 0.76 mmol, 86 % d. Th.) wurde als farbloser Feststoff erhalten.

1H NMR (CD_2Cl_2 , 300 MHz) δ 8.87 (dd, 1H, $J_1 = 4.1$ Hz, $J_2 = 1.6$ Hz), 8.19 (dd, 1H, $J_1 = 8.5$ Hz, $J_2 = 1.6$ Hz), 7.88 (d, 1H, $J = 8.7$ Hz), 7.80 (d, 1H, $J = 8.7$ Hz), 7.44 (dd, 1H, $J_1 = 8.3$ Hz, $J_2 = 4.1$ Hz), 5.57 (br m, 1H), 4.09 (t, 1H, $J = 3.4$ Hz), 3.96 (m, 2H), 2.91 (br m, 1H), 2.49 (dd, 1H, $J_1 = 18.1$ Hz, $J_2 = 10.7$ Hz), 2.31 (br m, 1H), 1.50 (s, 9H);

^{13}C NMR (CD_2Cl_2 , 75 MHz) δ 212.4, 176.2, 149.9, 144.1, 140.0, 134.9, 131.6, 128.1, 125.1, 122.5, 121.1, 81.4, 71.2, 60.7, 43.9, 38.5, 26.4;

ESI-MS m/z (%): 343.9 (100) $[M-H]^+$

HR-ESI-MS m/z (ber.) = 344.1492 $[M-H]^+$; m/z (gef.) = 344.1493 $[M-H]^+$

(29) 1β-(8-(Pivaloyloxy)chinolin-7-yl)-1,2-dideoxy-D-ribofuranose

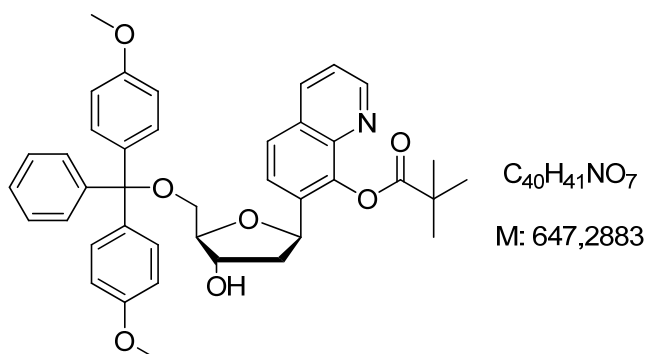
Zu einer Lösung von **28** (300 mg, 0.87 mmol) in 20 mL AcOH/MeCN (1:1) wurde bei 0°C unter Argon-Atmosphäre $NaBH(OAc)_3$ (275 mg, 1.3 mmol, 1.5 eq.) gegeben und die Reaktionsmischung wurde 20 min gerührt. Anschließend wurde die Reaktionsmischung mit 10mL EtOH/H₂O (1:1) versetzt und die Lösungsmittel wurden im Vakuum entfernt. Das Rohprodukt wurde mittels FC (CH₂Cl₂/MeOH 20:1) gereinigt. Das Produkt **29** (228 mg, 0.66 mmol, 76 % d. Th.) wurde als farbloser Feststoff erhalten.

¹H NMR (CD₂Cl₂, 600 MHz) δ 8.85(dd, 1H, $J_1 = 4.2$ Hz, $J_2 = 1.6$ Hz), 8.16 (dd, 1H, $J_1 = 8.3$ Hz, $J_2 = 1.6$ Hz), 7.75 (d, 1H, $J = 8.6$ Hz), 7.73 (d, 1H, $J = 8.6$ Hz), 7.40 (dd, 1H, $J_1 = 8.2$ Hz, $J_2 = 4.2$ Hz), 5.56 (br m, 1H), 4.36 (m, 1H), 3.99 (m, 1H), 3.78 (m, 2H), 2.56 (s, 1H), 2.25 (br m, 2H), 1.96 (br s, 1H), 1.50 (s, 9H);

¹³C NMR (CD₂Cl₂, 150 MHz) δ 177.2, 150.8, 144.6, 141.3, 136.0, 134.4, 128.9, 125.9, 124.0, 121.9, 87.6, 74.7, 73.8, 63.7, 43.6, 41.3, 27.6;

ESI-MS m/z (%): 346.0 (100) [M-H⁺]

HR-ESI-MS m/z (ber.) = 346.1649 [M-H⁺]; m/z (gef.) = 346.1650 [M-H⁺]

(30) 5-O-((bis(4-Methoxyphenyl)(phenyl)methoxy)-1 β -(8-(pivaloyloxy)chinolin-7-yl)-1,2-dideoxy-D-ribofuranose

29 (250 mg, 0.72 mmol) wurde in 5 mL abs. Pyridin gelöst und mit 4,4'-Dimethoxytritylchlorid (315 mg, 0.94 mmol) versetzt. Die Reaktionsmischung wurde 48 h bei RT gerührt. Die Reaktion wurde durch Zugabe von MeOH abgebrochen und das Lösungsmittel wurde entfernt. Nach Reinigung des Rohproduktes über FC (CH_2Cl_2 /Aceton 10:1) wurde **30** (290 mg, 0.45 mmol, 62 % d. Th.) als farbloser schaumiger Feststoff erhalten.

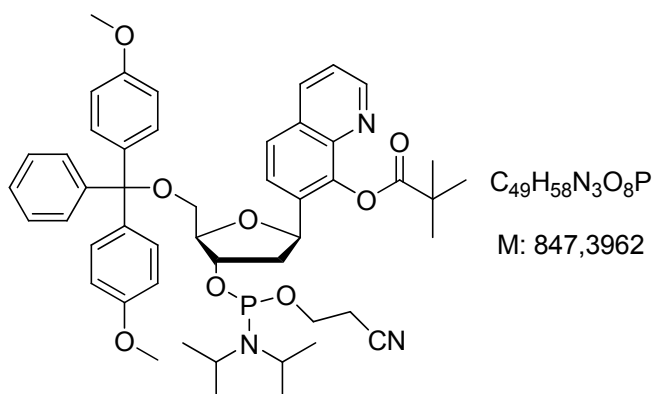
1H NMR (CD_2Cl_2 , 300 MHz) δ 8.86 (dd, 1H, $J_1 = 4.1$ Hz, $J_2 = 1.6$ Hz), 8.17 (dd, 1H, $J_1 = 8.2$ Hz, $J_2 = 1.6$ Hz), 7.84 (d, 1H, $J = 8.7$ Hz), 7.70 (d, 1H, $J = 8.5$ Hz), 7.53 (m, 2H), 7.41 (m, 5H), 7.25 – 7.35 (m, 3H), 6.87 (m, 4H), 5.58 (br m, 1H), 4.40 (m, 1H), 4.09 (m, 1H), 3.79 (s, 6H), 3.38 (d, 2H, $J = 4.7$ Hz), 1.99 (m, 1H), 1.52 (s, 9H);

^{13}C NMR (CD_2Cl_2 , 75 MHz) δ 176.3, 157.8, 149.6, 144.3, 143.1, 140.2, 135.2, 134.8, 133.8, 129.3, 127.6, 127.4, 127.0, 126.0, 124.6, 123.2, 120.6, 112.3, 85.4, 73.4, 73.2, 63.5, 54.4, 42.5, 38.5, 26.4;

ESI-MS m/z (%): 648.3 (100) $[M-H]^+$

HR-ESI-MS m/z (ber.) = 648.2956 $[M-H]^+$; m/z (gef.) = 648.2958 $[M-H]^+$

(31) 5-((bis(4-Methoxyphenyl)(phenyl)methoxy)-3-((2-cyanoethoxy)(diisopropylamino)phosphinooxy)-1 β -(8-(pivaloyloxy)chinolin-7-yl)-1,2-dideoxy-D-ribofuranose



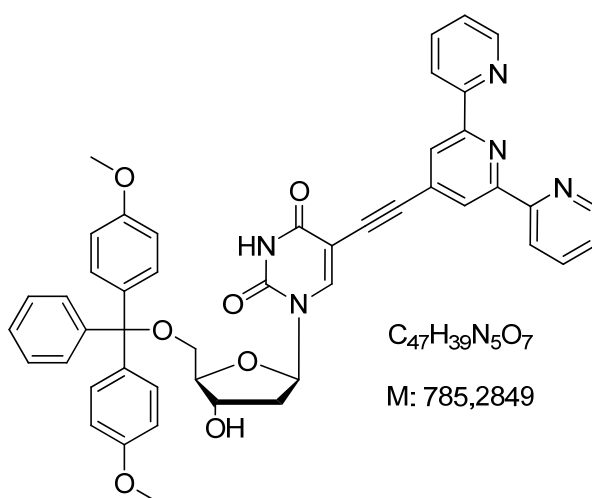
30 (200 mg, 0.31 mmol) wurde unter Argon-Atmosphäre in 3 mL abs. CH_2Cl_2 gelöst. Es wurden DIPEA (110 μ L, 0.62 mmol, 2 eq.) und 2-Cyanoethyl-*N,N*-diisopropylchlorophosphoramidit (105 μ L, 0.47 mmol, 1.5 eq.) zugegeben und 6 h bei RT gerührt. Die organische Phase wurde mit gesättigter aq. $NaHCO_3$ gewaschen und über Na_2SO_4 getrocknet. Nach Entfernen des Lösungsmittels wurde **31** (260 mg, 0.31 mmol, 99 % d. Th.) als farbloser Feststoff erhalten.

^{31}P NMR ($CDCl_3$, 121MHz) δ 149.5, 149.2;

9.2.5 Darstellung des terpyridinmodifizierten Uridin-Bausteins

Die Synthesen von 4'-Ethinyl-2,2':6',2''-terpyridin (**37**)^[296-298] und 2'-Deoxy-5'-O-(4,4'-dimethoxytrityl)-5-iodouridin^[299] sind bekannt und wurden nach Literaturvorschriften durchgeführt

(38) 5'-O-((bis(4-Methoxyphenyl)(phenyl)methoxy)-5-(4'-Ethinyl-2,2':6',2''-terpyridinyl)-2'-deoxyuridin



2'-Deoxy-5'-O-(4,4'-dimethoxytrityl)-5-iodouridin (460 mg, 0.70 mmol) wurde unter Argon-Atmosphäre in abs. THF (10 mL) gelöst. Anschließend wurden 4'-Ethinyl-2,2':6',2''-terpyridin (**37**, 150 mg, 0.58 mmol), Pd(PPh₃)₂Cl₂ (40 mg, 0.057 mmol), CuI (11 mg, 0.058 mmol) und abs. NEt₃ (5 mL) zugegeben und die Reaktionsmischung wurde 5 h bei 60°C gerührt. Das Lösungsmittel wurde entfernt und das Rohprodukt wurde zunächst über FC (CH₂Cl₂/MeOH 10:1 + 3% NEt₃) vorgereinigt. Anschließend wurde das Produkt über Flash-RP-Chromatographie (Methanol) gereinigt. Es wurden 264 mg **38** (0.34 mmol, 58% d. Th.) als farbloser Feststoff erhalten.

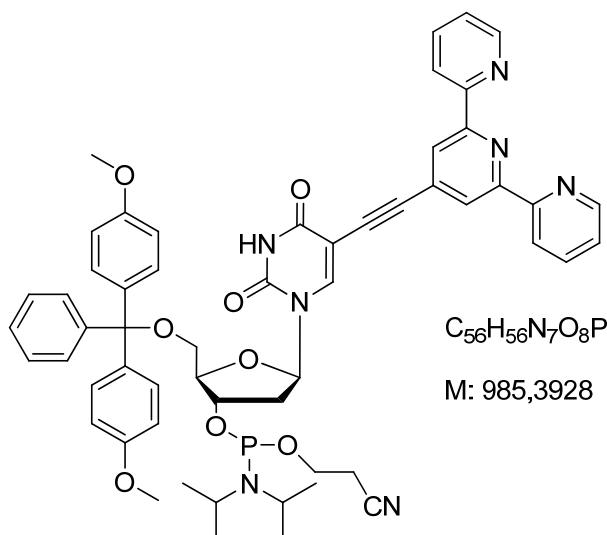
¹H NMR (CD₂Cl₂, 600 MHz) δ 8.61 (d, 2H, *J* = 3.8 Hz), 8.56 (d, 2H, *J* = 7.9 Hz), 8.26 (s, 2H), 8.13 (s, 1H), 7.85 (t, 2H, *J* = 7.6 Hz), 7.41 (d, 2H, *J* = 7.6 Hz), 7.32 (m, 6H), 7.21 (t, 2H, *J* = 7.6 Hz), 7.11 (t, 1H, *J* = 7.3 Hz), 6.75 (m, 4H), 6.33 (t, 1H, *J* = 5.8 Hz), 4.61 (m, 1H), 4.14 (m, 1H), 3.60 (2 x s, 2 x 3H), 3.41 (dd, 1H, *J*₁ = 10.5 Hz, *J*₂ = 3.8 Hz), 3.31 (dd, 1H, *J*₁ = 10.5 Hz), 2.59 (m, 1H), 2.46 (td, 1H, *J*₁ = *J*₂ = 6.6 Hz);

^{13}C NMR (CD_2Cl_2 , 150 MHz) δ 161.6, 159.0, 159.0, 155.8, 155.8, 149.7, 149.5, 145.0, 144.0, 137.2, 136.1, 135.7, 132.8, 130.3, 130.2, 128.4, 128.2, 127.3, 124.4, 123.0, 121.4, 113.6, 113.6, 99.6, 91.7, 87.2, 86.9, 86.4, 85.3, 72.2, 64.1, 55.4, 41.8;

FAB-MS m/z (%): 303.2 (100) $[\text{DMT}^+]$, 439.2 (5) $[\text{M-H}^+]$

HR-FAB-MS m/z (ber.) = 786.2928 $[\text{M-H}^+]$; m/z (gef.) = 786.2903 $[\text{M-H}^+]$

(39) 3'-O-((2-Cyanoethoxy)(diisopropylamino)phosphinyl)-5'-O-((bis-(4-methoxyphenyl)(phenyl)methoxy)-5-(4'-Ethynyl-2,2':6',2''-terpyridinyl)-2'-deoxyuridin



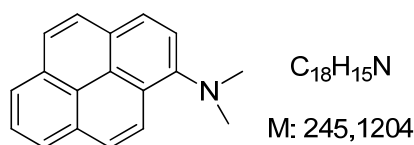
38 (100 mg, 0.13 mmol) wurde unter Argon-Atmosphäre in 3 mL abs. DCM gelöst. Es wurden DIPEA (110 μL , 0.64 mmol) und 2-Cyanoethyl-*N,N*-diisopropylchlorophosphoramidit (114 μL , 0.51 mmol) zugegeben und über Nacht bei RT gerührt. Die organische Phase wurde mit gesättigter aq. NaHCO_3 gewaschen und über Na_2SO_4 getrocknet. Nach Entfernen des Lösungsmittels wurde **39** (125 mg, 0.13 mmol, 99% d. Th.) als farbloses Öl erhalten

^{31}P NMR (d_6 -DMSO, 121MHz) δ 148.7, 148.4;

9.2.6 Darstellung des Dimethylaminopyren-modifizierten Uridins

Die Synthese für 2-Aminopyren (**41**) erfolgte in zwei Stufen nach Literaturbedingungen.^[338]

(42) 1-(*N,N*-Dimethylamino)pyren



Eine Mischung aus 3 M H_2SO_4 (7 mL; 21 mmol) und 35 %iger wässriger Formaldehydlösung (8.3 mL, 110 mmol) in 50 mL THF wurde bei 10°C langsam unter starkem Rühren mit einer Suspension aus 1-Aminopyren (5.88 g; 27.1 mmol) und fein gepulvertem $NaBH_4$ (6.03 g; 158 mmol) in 50 mL THF versetzt. Dabei wurde nach der Hälfte der Zugabe die Reaktionsmischung nochmals mit 7 mL 3 M H_2SO_4 angesäuert. Nach Abschluss der Zugabe wurde die Reaktionsmischung erst mit 50 mL H_2O und dann solange mit festem KOH versetzt bis ein stark basischer pH-Wert erreicht war. Die Reaktionsmischung wurde dreimal mit je 50 mL Diethylether extrahiert. Die organischen Phasen wurden vereinigt und über Na_2SO_4 getrocknet. Nach Entfernen des Lösungsmittels wurde das Produkt über FC (Hexan/Diethylether 10:1) gereinigt. Es wurden 4.30 g (17.5 mmol; 65% d. Th) eines zähflüssigen orangen Öls erhalten.

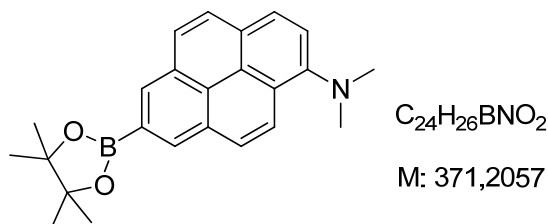
1H NMR ($CDCl_3$, 300 MHz) δ 8.54 (d, 1H, $J = 9.0$ Hz), 8.12 – 8.19 (m, 4H), 7.95 – 8.05 (m, 3H), 7.77 (d, 1H, $J = 8.2$ Hz), 3.10 (s, 6H);

^{13}C NMR ($CDCl_3$, 75 MHz) δ 147.8, 130.5, 130.2, 126.2, 125.9, 125.2, 124.9, 124.8, 124.4, 124.2, 124.1, 123.3, 123.2, 122.4, 115.3, 44.5;

EI-MS m/z (%): 245.2 (100) [M^{++}]

HR-EI-MS m/z (ber.) = 245.1204 [M^{++}]; m/z (gef.) = 245.1205 [M^{++}]

(43) 1-(*N,N*-Dimethylamino)-7-(4,4,5,5-tetramethyl-1,3,2-dioxaborolan-2-yl)pyren



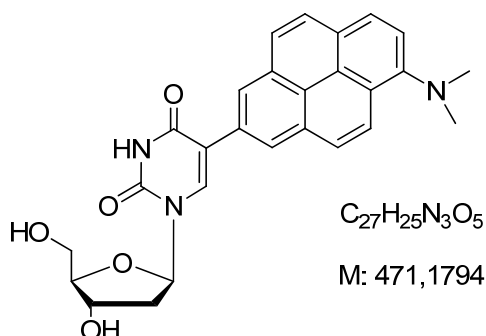
[Ir(OMe)(COD)]₂ (142 mg, 0.21 mmol) wurde unter Ar-Atmosphäre in 15 mL abs. Cyclohexan gelöst und die Mischung wurde 15 min mit Argon gespült. Es wurde eine Lösung von 1-(*N,N*-Dimethylamino)-pyren (900 mg, 4.1 mmol), Bis(pinakolato)-diboran (1.20 g; 4.7 mmol; 1.1 eq) und dtbpy (110 mg; 0.41 mmol) in 40 mL abs. Cyclohexan zugegeben. Der Ansatz wurde 20 h bei 80°C gerührt. Das Lösungsmittel wurde entfernt und das Produkt wurde über FC gereinigt (Hexan/Diethylether 10:1). Es wurden 1.03 g (2.77 mmol; 67% d. Th.) eines gelben Feststoffs erhalten.

¹H NMR (CDCl₃, 600 MHz) δ 8.60 (s, 1H), 8.57 (s, 1H), 8.49 (d, 1H, *J* = 9.1 Hz), 8.12 (d, 1H, *J* = 9.3 Hz), 8.09 (d, 1H, *J* = 8.1 Hz), 7.96 (m, 2H), 7.76 (d, 1H, *J* = 8.3 Hz), 3.07 (s, 6H), 1.47 (s, 12H);

¹³C NMR (CDCl₃, 150 MHz) δ 130.9, 130.8, 130.5, 127.7, 127.1, 127.0, 126.9, 126.1, 125.9, 125.9, 125.1, 124.9, 123.1, 116.9, 84.1, 45.7, 25.0;

EI-MS *m/z* (%): 371.4 (100) [M⁺⁺]

HR-EI-MS *m/z* (ber.) = 371.2057 [M⁺⁺]; *m/z* (gef.) = 371.2063 [M⁺⁺]

(44) 5-(6-*N,N*-Dimethylamino-2-pyrenyl)-2'-deoxyuridin

5-Iodo-2'-deoxyuridin (500 mg, 1.4 mmol) wurden in $H_2O/MeCN$ 1:2 (30 mL) gelöst und die Lösung wurde 30 min mit Argon gespült. Anschließend wurden unter Rühren nacheinander **43** (628 mg, 1.7 mmol), Na_2CO_3 (300 mg, 2.8 mmol) und $Pd(dppf)_2Cl_2$ (130 mg, 0.14 mmol) zugegeben und die Reaktionsmischung wurde über Nacht bei 70°C gerührt. Nach Abkühlen auf Raumtemperatur wurden 20 mL H_2O zugegeben und die Reaktionsmischung wurde mit ges. NH_4Cl -Lsg. neutralisiert. Die Reaktionsmischung wurde dreimal mit je 50 mL Ethylacetat extrahiert. Die organischen Phasen wurden vereinigt und über Na_2SO_4 getrocknet. Nach Entfernen des Lösungsmittels wurde das Rohprodukt über FC ($CH_2Cl_2/MeOH$ 20:1) gereinigt. Das Produkt **44** (452 mg, 0.96 mmol; 68% d. Th) wurde als gelber Feststoff erhalten.

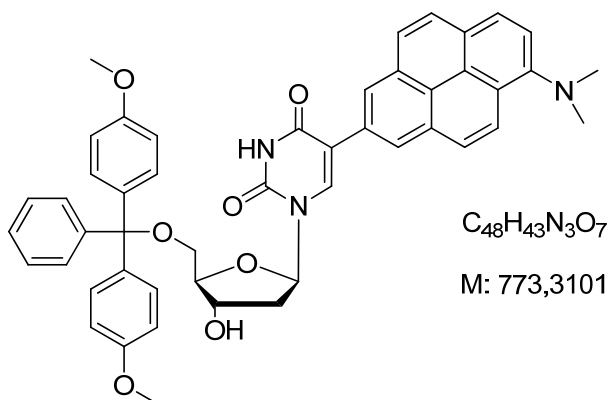
1H NMR (MeOD, 600 MHz) δ 8.36 (s, 1H), 8.28 (d, 1H, $J = 9.1$ Hz), 8.14 (d, 1H, $J = 1.4$ Hz), 8.11 (d, 1H, $J = 1.4$ Hz), 7.94 (d, 1H, $J = 8.3$ Hz), 7.91 (d, 1H, $J = 9.3$ Hz), 7.81 (d, 1H, $J = 8.8$ Hz), 7.76 (d, 1H, $J = 8.8$ Hz), 7.61 (d, 1H, $J = 8.3$ Hz), 6.26 (t, 1H, $J = 6.6$ Hz), 4.40 (td, 1H, $J_1 = 6.0$ Hz, $J_2 = 3.7$ Hz), 3.94 (dd, 1H, $J_1 = 6.4$ Hz, $J_2 = 3.1$ Hz), 3.79 (dd, 1H, $J_1 = 11.9$ Hz, $J_2 = 2.9$ Hz), 3.70 (dd, 1H, $J_1 = 11.9$ Hz, $J_2 = 3.2$ Hz), 2.89 (s, 6H), 2.29 (ddd, 1H, $J_1 = 13.8$ Hz, $J_2 = 6.4$ Hz, $J_3 = 4.0$ Hz), 2.22 (td, 1H, $J_1 = 13.8$ Hz, $J_2 = 6.4$ Hz);

^{13}C NMR ($CDCl_3$, 150 MHz) δ 164.7, 151.8, 150.1, 140.1, 132.8, 132.4, 131.8, 128.5, 128.4, 127.4, 126.8, 126.6, 126.5, 125.5, 125.5, 125.2, 125.0, 124.5, 117.6, 116.0, 89.0, 86.9, 72.0, 62.5, 45.9, 41.7;

FAB-MS m/z (%): 472.4 (100) $[M-H]^+$

LSI-MS m/z (ber.) = 471.1794 [M^{++}]; m/z (gef.) = 471.1790 [M^{++}]

(45) 5'-O-((bis(4-Methoxyphenyl)(phenyl)methoxy)-5-(6-*N,N*-Dimethylamino-2-pyrenyl)-2'-deoxyuridin



44 (300 mg, 0.64 mmol) wurde in abs. Pyridin gelöst und mit 4,4'-Dimethoxytritylchlorid (280 mg, 0.83 mmol) versetzt. Die Reaktionsmischung wurde über Nacht bei 30°C gerührt. Anschließend wurde die Reaktion durch Zugabe von MeOH abgebrochen und das Lösungsmittel wurde entfernt. Der Rückstand wurde in 50 mL Ethylacetat aufgenommen und mit 50 mL ges. NaCl-Lösung extrahiert. Die wässrige Phase wurde mit 50 mL Ethylacetat gewaschen. Die organischen Phasen wurden vereinigt und über Na_2SO_4 getrocknet. Das Lösungsmittel wurde entfernt und das Rohprodukt durch FC (CH_2Cl_2 /Aceton 10:1) gereinigt. Das Produkt **45** (381 mg, 0.49 mmol, 77% d. Th.) wurde als gelber Feststoff erhalten.

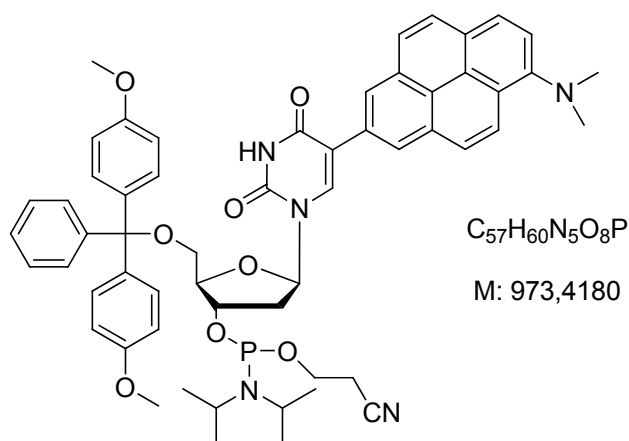
1H NMR (CD_2Cl_2 , 300 MHz) δ 9.92 (br s, 1H), 8.31 (d, 1H, J = 9.3 Hz), 8.07 (d, 1H, J = 8.3 Hz), 8.01 (s, 2H), 7.99 (s, 1H), 7.86 (d, 1H, J = 9.1 Hz), 7.73 (d, 1H, J = 8.5 Hz), 7.63 (d, 1H, J = 9.3 Hz), 7.52 (d, 1H, J = 9.1 Hz), 7.33 (m, 2H), 7.03 – 7.15 (m, 7H), 6.48 (m, 1H), 6.42 (m, 4H), 4.55 (m, 1H), 4.14 (dd, 1H, J_1 = 5.8 Hz, J_2 = 3.0 Hz), 3.39 (s, 3H), 3.37 (s, 3H), 3.35 (m, 1H), 3.24 (dd, 1H, J_1 = 10.4 Hz, J_2 = 3.6 Hz), 3.03 (s, 6H), 2.61 (m, 1H), 2.40 (m, 1H);

^{13}C NMR (CD_2Cl_2 , 75 MHz) δ 161.9, 157.6, 157.6, 149.6, 148.4, 143.8, 137.1, 134.7, 134.5, 130.7, 130.4, 129.3, 129.0, 127.1, 127.0, 126.6, 126.1, 126.0, 125.4, 124.8,

124.6, 124.5, 123.7, 123.6, 123.4, 122.8, 115.8, 115.2, 112.0, 85.8, 85.7, 85.0, 71.5, 62.7, 54.0, 54.0, 44.6, 40.6;

ESI-MS m/z (%): 774.4 (100) $[M-H]^+$

(46) 3'-O-((2-Cyanoethoxy)(diisopropylamino)phosphinyl)-5'-O-((bis(4-methoxyphenyl)(phenyl)methoxy)-5-(6-*N,N*-Dimethylamino-2-pyrenyl)-2'-deoxyuridin



45 (150 mg, 0.19 mmol) wurde unter Argon in 3 mL abs. CH_2Cl_2 gelöst. Es wurden DIPEA (68 μ L, 0.39 mmol) und 2-Cyanoethyl-*N,N*-diisopropylchlorophosphoramidit (63 μ L, 0.28 mmol) zugegeben und 4 h bei RT gerührt. Die organische Phase wurde mit gesättigter aq. $NaHCO_3$ gewaschen und über Na_2SO_4 getrocknet. Nach Entfernen des Lösungsmittels wurde **46** (175 mg, 0.18 mmol, 95% d. Th.) als gelber Schaum erhalten.

^{31}P NMR ($CDCl_3$, 121MHz) δ 149.5, 149.1;

9.3 Synthese und Charakterisierung von Oligonukleotiden

9.3.1 Verwendete Oligonukleotidsequenzen

Im Folgenden sind die Sequenzen der verwendeten modifizierten Oligonukleotide, sowie deren MS-Analytik und molare Extinktionskoeffizienten angegeben.

„Mega-Stokes-Dye“-modifizierte Oligonukleotide

M1-DNA1	5' GGC – TAT – TAA – TAM ^{M1} – AAC – TCG – CG 3'
M2-DNA1	5' CGC – GAG – TT ^{M2} – TAT – TAA – TAG – CC 3'
M2-DNA2	5' CGC – GAG – TTA – ^{M2} AT – TAA – TAG – CC 3'
M2-DNA3	5' CGC – GAG – TTA – TAA – ^{M2} AA – TAG – CC 3'
M2-DNA1	5' CGC – GAG – TT ^{M3} – TAT – TAA – TAG – CC 3'
M2-DNA2	5' CGC – GAG – TTA – ^{M3} AT – TAA – TAG – CC 3'
M2-DNA3	5' CGC – GAG – TTA – TAA – ^{M3} AA – TAG – CC 3'

Tabelle 25: ESI-Massen und ϵ -Werte der „Mega-Stokes-Dye“-modifizierten Oligonukleotide

DNA-Strang (Modifikation)	errechnete Masse [g/mol]	gefundene Masse [g/mol]	ϵ_{260} [mM ⁻¹ cm ⁻¹]
M1-DNA1	6462	2154.0 [M-3H ⁺] ³⁻ 1615.1 [M-4H ⁺] ⁴⁻	199.7
M2-DNA1	6628	2209.7 [M-3H ⁺] ³⁻ 1656.8 [M-4H ⁺] ⁴⁻	189.8
M2-DNA2	6637	2212.5 [M-3H ⁺] ³⁻ 1659.2 [M-4H ⁺] ⁴⁻	195.8
M2-DNA3	6637	2212.7 [M-3H ⁺] ³⁻ 1659.2 [M-4H ⁺] ⁴⁻	195.8
M3-DNA1	6600	2200.6 [M-3H ⁺] ³⁻ 1649.9 [M-4H ⁺] ⁴⁻	198.2
M3-DNA2	6609	2203.4 [M-3H ⁺] ³⁻ 1652.0 [M-4H ⁺] ⁴⁻	204.2
M3-DNA3	6609	2003.4 [M-3H ⁺] ³⁻ 1652.0 [M-4H ⁺] ⁴⁻	204.2

Bo-modifizierte Oligonukleotide

Bo-DNA1	5' AGT – CAC – TT Bo – TTC – TGA – CG 3'
Bo-DNA2	5' AGT – CAC – TG Bo – GTC – TGA – CG 3'
Bo-DNA3	5' AGT – CAC – TT Bo – Bo TC – TGA – CG 3'
Bo-DNA4	5' AGT – CAC – T Bo T – T Bo C – TGA – CG 3'

Tabelle 26: ESI-Massen und Extinktionskoeffizienten der mit **Bo** modifizierten Oligonukleotide

DNA-Strang (Modifikation)	errechnete Masse [g/mol]	gefundene Masse [g/mol]	ϵ_{260} [mM ⁻¹ cm ⁻¹]
Bo-DNA1	5478	1825.7 [M-3H ⁺] ³⁻	151.2
		1368.9 [M-4H ⁺] ⁴⁻	
Bo-DNA2	5528	1842.2 [M-3H ⁺] ³⁻	156.4
		1381.4 [M-4H ⁺] ⁴⁻	
Bo-DNA3	5808	1935.3 [M-3H ⁺] ³⁻	147.5
		1451.3 [M-4H ⁺] ⁴⁻	
Bo-DNA4	5808	1935.5 [M-3H ⁺] ³⁻	147.5
		1451.2 [M-4H ⁺] ⁴⁻	

BodU-modifizierte Oligonukleotide

BodU-DNA1	5' AGT – CAC – TT BodU – TTC – TGA – CG 3'
BodU-DNA2	5' AGT – CAC – TG BodU – GTC – TGA – CG 3'

Tabelle 27: ESI-Massen und Extinktionskoeffizienten der mit **BodU** modifizierten Oligonukleotide

DNA-Strang (Modifikation)	errechnete Masse [g/mol]	gefundene Masse [g/mol]	ϵ_{260} [mM ⁻¹ cm ⁻¹]
BodU-DNA1	5513	1837.9 [M-3H ⁺] ³⁻	160.4
		1378.2 [M-4H ⁺] ⁴⁻	
BodU-DNA2	5563	1854.7 [M-3H ⁺] ³⁻	165.6
		1390.8 [M-4H ⁺] ⁴⁻	

Fluorescein-modifizierte Oligonukleotid

Der mit Fluorescein modifizierte Oligonukleotidstrang **Flu-DNA1** (Sequenz wie **Bo-DNA1**) wurde von *Metabion* bezogen.

Hydroxychinolin-modifizierte Oligonukleotide

HQ1	5' AGT – CAG – TAT – HQ AT – GAC – TGA 3'
HQ2	5' AGT – CAG – TAT – HQHQA – TGA – CTG – A 3'
HQ3	5' AGT – CAG – TAT – HQHQA – ATG – ACT – GA 3'
HQ4	5' TCA – GTC – AT HQ – ATA – CTG – ACT 3'
HQ5	5' TCA – GTC – AT HQ – HQ AT – ACT – GAC – T 3'
HQ6	5' TCA – GTC – AT HQ – HQHQA – TAC – TGA – CT 3'

Tabelle 28: ESI-Massen und Extinktionskoeffizienten der mit **HQ** modifizierten Oligonukleotide

DNA-Strang (Modifikation)	errechnete Masse [g/mol]	gefundene Masse [g/mol]	ϵ_{260} [mM ⁻¹ cm ⁻¹]
HQ1	5553	1851.0 [M-3H ⁺] ³⁻ 1387.8 [M-4H ⁺] ⁴⁻	179.6
HQ2	5875	1953.4 [M-3H ⁺] ³⁻ 1468.7 [M-4H ⁺] ⁴⁻	181.1
HQ3	6198	2065.9 [M-3H ⁺] ³⁻ 1549.4 [M-4H ⁺] ⁴⁻	182.6
HQ4	5464	1821.3 [M-3H ⁺] ³⁻ 1365.7 [M-4H ⁺] ⁴⁻	165.7
HQ5	5786	1928.6 [M-3H ⁺] ³⁻ 1446.3 [M-4H ⁺] ⁴⁻	167.2
HQ6	6109	2036.9 [M-3H ⁺] ³⁻ 1527.3 [M-4H ⁺] ⁴⁻	168.7

Terpyridin-modifizierte Oligonukleotide

Terp1	5' GCA – GTC – TT X – TTC – ACT – GA 3'	X = TerpdU
Terp2	5' TCA – GTG – AA X – AAG – ACT – GC 3'	
Terp3	5' X TA – GTC – TTG – TTC – ACT – GA 3'	
Terp4	5' X CA – GTG – AAC – AAG – CAT – AA 3'	
Terp5	5' GAC – GTC – TG X – GTC – ACT – GA 3'	
Terp6	5' TCA – GTG – AC X – CAG – ACT – GC 3'	

Tabelle 29: ESI-Massen und Extinktionskoeffizienten der mit **TerpdU** modifizierten Oligonukleotide

DNA-Strang (Modifikation)	errechnete Masse [g/mol]	gefundene Masse [g/mol]	ϵ_{260} [mM ⁻¹ cm ⁻¹]
Terp1	5390	1796.7 [M-3H ⁺] ³⁻	162.9
		1347.2 [M-4H ⁺] ⁴⁻	
Terp2	5457	1819.0 [M-3H ⁺] ³⁻	184.7
		1363.9 [M-4H ⁺] ⁴⁻	
Terp3	5405	1801.8 [M-3H ⁺] ³⁻	164.3
		1351.0 [M-4H ⁺] ⁴⁻	
Terp4	5450	1816.8 [M-3H ⁺] ³⁻	194.0
		1362.2 [M-4H ⁺] ⁴⁻	
Terp5	5440	1813.3 [M-3H ⁺] ³⁻	168.2
		1359.6 [M-4H ⁺] ⁴⁻	
Terp6	5409	1803.2 [M-3H ⁺] ³⁻	170.1
		1351.9 [M-4H ⁺] ⁴⁻	

DIMAPdU-modifizierte Oligonukleotide

DIMAP-DNA1 5' GCA – GTC – TT**X** – TTC – ACT – GA 3' **X** = DIMAPdU

DIMAP-DNA2 5' GCA – GTC – TG**X** – GTC – ACT – GA 3'

DIMAP1 5' TCA – GTC – A**X**T – ATA – CTG – ACT 3' **X** = DIMAPdU

DIMAP2 5' TCA – GTC – A**X**T – TAT – ACT – GAC – T 3'

DIMAP3 5' TCA – GTC – A**X**T – TTA – TAC – TGA – CT 3'

DIMAP4 5' TCA – GTC – A**X**C – ATA – CGT – ACT 3'

DIMAP5 5' TCA – GTC – A**X**C – CAT – ACT – GAC – T 3'

DIMAP6 5' TCA – GTC – A**X**C – CCA – TAC – TGA – CT 3'

Tabelle 30: ESI-Massen und Extinktionskoeffizienten der mit **DIMAPdU** modifizierten Oligonukleotide

DNA-Strang (Modifikation)	errechnete Masse [g/mol]	gefundene Masse [g/mol]	ϵ_{260} [mM ⁻¹ cm ⁻¹]
DIMAP-DNA1	5378	1792.8 [M-3H ⁺] ³⁻	183.2
		1344.3 [M-4H ⁺] ⁴⁻	
DIMAP-DNA2	5428	1809.7 [M-3H ⁺] ³⁻	188.4
		1356.8 [M-4H ⁺] ⁴⁻	

DIMAP1	5675	1892.0 [M-3H ⁺] ³⁻ 1418.5 [M-4H ⁺] ⁴⁻	200.3
DIMAP2	5979	1991.3 [M-3H ⁺] ³⁻ 1494.8 [M-4H ⁺] ⁴⁻	208.3
DIMAP3	6283	2095.0 [M-3H ⁺] ³⁻ 1570.8 [M-4H ⁺] ⁴⁻	216.2
DIMAP4	5660	1886.8 [M-3H ⁺] ³⁻ 1414.7 [M-4H ⁺] ⁴⁻	198.9
DIMAP5	5949	1983.7 [M-3H ⁺] ³⁻ 1487.2 [M-4H ⁺] ⁴⁻	205.6
DIMAP6	6238	2079.7 [M-3H ⁺] ³⁻ 1559.5 [M-4H ⁺] ⁴⁻	212.1

Nilrot-modifizierte Oligonukleotide

NR1	5' ATG – CAG – TAX – AAT – GAC – TGA 3' X = NRdU
NR2	5' ATG – CAG – TAX – AAA – TGA – CTG – A 3'
NR3	5' ATG – CAG – TAX – AAA – ATG – ACT – GA 3'
NR4	5' ATG – CAG – TAX – GAT – GAC – TGA 3'
NR5	5' ATG – CAG – TAX – GGA – TGA – CTG – A 3'
NR6	5' ATG – CAG – TAX – GGG – ATG – ACT – GA 3'

Tabelle 31: ESI-Massen und Extinktionskoeffizienten der mit **NRdU** modifizierten Oligonukleotide

DNA-Strang (Modifikation)	errechnete Masse [g/mol]	gefundene Masse [g/mol]	ϵ_{260} [mM⁻¹ cm⁻¹]
NR1	5870	1957.0 [M-3H ⁺] ³⁻ 1467.3 [M-4H ⁺] ⁴⁻	220.2
NR2	6184	2061.4 [M-3H ⁺] ³⁻ 1545.7 [M-4H ⁺] ⁴⁻	234.0
NR3	6497	2165.8 [M-3H ⁺] ³⁻ 1624.0 [M-4H ⁺] ⁴⁻	247.9
NR4	5887	1962.3 [M-3H ⁺] ³⁻ 1471.2 [M-4H ⁺] ⁴⁻	216.8
NR5	6216	2072.1 [M-3H ⁺] ³⁻ 1553.7 [M-4H ⁺] ⁴⁻	227.4
NR6	6545	2181.9 [M-3H ⁺] ³⁻ 1636.0 [M-4H ⁺] ⁴⁻	237.9

N-Phenylsulfonylindol-modifizierte Oligonukleotide

In1	5' ATG – CAG– TA In – AAT – GAC – TGA 3'
In2	5' ATG – CAG – TA In – AAA – TGA – CTG – A 3'
In3	5' ATG – CAG – TA In – AAA – ATG – ACT – GA 3'
In4	5' ATG – CAG– TA In – GAT – GAC – TGA 3'
In5	5' ATG – CAG – TA In – GGA – TGA – CTG – A 3'
In6	5' ATG – CAG – TA In – GGG – ATG – ACT – GA 3'

DNA-Strang (Modifikation)	errechnete Masse [g/mol]	gefundene Masse [g/mol]	ϵ_{260} [mM ⁻¹ cm ⁻¹]
In1	5675	5676	192.0
In2	5988	5986	205.9
In3	6301	6300	219.8
In4	5691	5690	188.7
In5	6020	6019	199.2
In6	6349	6349	209.8

DAP²⁺-modifizierte Oligonukleotide

DAP1	5' ATG – CAG– TA X – AAT – GAC – TGA 3'	X = DAP ²⁺
DAP2	5' ATG – CAG – TA X – AAA – TGA – CTG – A 3'	
DAP3	5' ATG – CAG – TA X – AAA – ATG – ACT – GA 3'	
DAP4	5' ATG – CAG– TA X – GAT – GAC – TGA 3'	
DAP5	5' ATG – CAG – TA X – GGA – TGA – CTG – A 3'	
DAP6	5' ATG – CAG – TA X – GGG – ATG – ACT – GA 3'	

DNA-Strang (Modifikation)	errechnete Masse [g/mol]	gefundene Masse [g/mol]	ϵ_{260} [mM ⁻¹ cm ⁻¹]
DAP1	5887	5887	197.3
DAP2	6200	6200	211.2
DAP3	6513	6512	225.0
DAP4	5903	5904	193.9
DAP5	6232	6232	204.5
DAP6	6561	6560	215.0

Oligonukleotide zur Untersuchung des Ladungstransfers über HQ-Basenpaare

DIMAPHQ1 5' TCA – GTC – A**X**HQ – ATA – CTG – ACT 3' **X** = DIMAPdU

DIMAPHQ2 5' TCA – GTC – A**X**HQ – **HQ**AT – ACT – GAC – T 3'

DAPHQ1 5' ATG – CAG – T**A****X** – **HQ**AT – GAC – TGA 3' **X** = DAP²⁺

DAPHQ2 5' ATG – CAG – T**A****X** – **HQ**HQ**A** – TGA – CTG – A 3'

DNA-Strang (Modifikation)	errechnete Masse [g/mol]	gefundene Masse [g/mol]	ϵ_{260} [mM ⁻¹ cm ⁻¹]
DAIMAPHQ1	5693	1897.5 [M-3H ⁺] ³⁻ 1422.8 [M-4H ⁺] ⁴⁻	194.0
DIMAPHQ2	6015	2006.9 [M+3H ⁺] ³⁺ 1505.7 [M+4H ⁺] ⁴⁺	195.5
DAPHQ1	5896	1964.4 [M ²⁺ -5H ⁺] ³⁻ 1473.2 [M ²⁺ -6H ⁺] ⁴⁻	195.2
DAPHQ2	6218	2072.3 [M ²⁺ -5H ⁺] ³⁻ 1554.3 [M ²⁺ -6H ⁺] ⁴⁻	196.7

9.3.2 Kupplungsprotokolle

Der Syntheseprogramm fördert die Reagenzien aus ihren Reservoirs in Pulsen zu je 16 µL durch die Reaktionsgefäße. Die Kupplungsprotokolle bestehen aus Einzelschritten, die die geförderte Substanz, die Zahl der Pulse und die Zeitdauer des Schrittes festlegen. Eine Zeitdauer von 0 s bedeutet, dass der Einzelschritt schnellstmöglich durchlaufen wird. Für den Einbau der kommerziell erhältlichen Phosphoramidite der natürlichen DNA-Basen werden diese in abs. MeCN gelöst (c = 0.067 M) und nach einem Standardsyntheseprotokoll in Oligonukleotide eingeführt (Tabelle 32). Dieses Standardverfahren wird für die einzelnen Sonderbausteine nur im Bereich „\$ Coupling“ verändert.

Tabelle 32: Standardprotokoll zur Kupplung der natürlichen Phosphoramidite von A, G, C, T.
 Erläuterungen: **Dbk**: 3 % Dichloressigsäure in CH₂Cl₂; **Wsh**: MeCN; **Act**: 0,45 M Tetrazol in MeCN;
Caps: Ac₂O in THF/Pyridin (Cap A) und N-Methylimidazol in THF/Pyridin (Cap B); **Ox**: Iod in Wasser/THF/Pyridin.

Codierung	Funktion	Modus	Menge /Arg1	Zeit (s) /Arg2
\$ Deblocking				
144	Index Fract. Coll.	NA	1	0
0	Default	WAIT	0	1.5
141	Trityl Mon. On/Off	NA	1	1
16	Dbk	PULSE	10	0
16	Dbk	PULSE	50	49
38	Diverted Wsh A	PULSE	40	0
141	Trityl Mon. On/Off	NA	0	1
38	Diverted Wsh A	PULSE	40	0
144	Index Fract. Coll.	NA	2	0
\$ Coupling				
1	Wsh	PULSE	5	0
2	Act	PULSE	5	0
18	A + Act	PULSE	5	0
18	A + Act	PULSE	2	16
2	Act	PULSE	3	24
1	Wsh	PULSE	7	56
1	Wsh	PULSE	8	0
\$ Capping				
12	Wsh A	PULSE	20	0
13	Caps	PULSE	8	0
12	Wsh A	PULSE	6	15
12	Wsh A	PULSE	14	0
\$ Oxidizing				
15	Ox	PULSE	15	0
12	Wsh A	PULSE	15	0
\$ Capping				
13	Caps	PULSE	7	0
12	Wsh A	PULSE	30	0

Alle Sonderbausteine wurden als 0.1 M Lösungen in abs. MeCN bzw. MeCN/CH₂Cl₂ 1:1 (NRdU) in den Syntheseautomaten eingebracht. Die Kupplungszeiten wurden im Vergleich zum Standardprotokoll von 96 s auf 500 s verlängert. Tabelle 33 gibt ein repräsentatives Kupplungsprotokoll, wie es für den Einbau von Sonderbausteinen verwendet wurde wieder.

Tabelle 33: Repräsentatives Kupplungsprotokoll für die Einführung von Sonderbausteinen in Oligonukleotide

Codierung	Funktion	Modus	Menge /Arg1	Zeit (s) /Arg2
\$ Coupling				
1	Wsh	PULSE	5	0
2	Act	PULSE	5	0
22	5 + Act	PULSE	5	0
22	5 + Act	PULSE	2	100
2	Act	PULSE	4	200
1	Wsh	PULSE	7	200
1	Wsh	PULSE	8	0

9.3.3 Aufarbeitung und Reinigung der Oligonukleotide

Nach erfolgter DNA-Synthese wurden die CPG-Säulen im Hochvakuum getrocknet und anschließend geöffnet. Das CPG-Granulat wurde in Eppendorf-Reaktionsgefäße überführt und mit 700 µL konzentrierter Ammoniumhydroxid-Lösung (> 25 %, *trace select*, *Fluka*) versetzt. Alle Oligonukleotide wurden bei 55 °C innerhalb von 10 h entschlüsselt und von der festen Phase abgespalten. Nach dem Abkühlen wurde das CPG über Zentrifugenfilter abgetrennt und zweimal mit 300 µL Wasser gewaschen. Die vereinigten Filtrate wurden anschließend in einem Vakuumkonzentrator *Christ Alpha RVC* (35 min., Heizung 30 min., 35 °C, 100 mbar) vom Ammoniak befreit. Die wässrigen Lösungen wurden in flüssigem Stickstoff ausgefroren und lyophilisiert. Zur Reinigung mittels *reversed-phase* HPLC wurden die gefriergetrockneten Proben in 300 µL Wasser aufgenommen. Oligonukleotide, die postsynthetisch modifiziert wurden, mussten nach erfolgter postsynthetischer Modifikation zunächst entsalzt werden, ehe sie durch *reversed-phase* HPLC getrennt werden konnten. Zur Analytik

und präparativen Trennung der Oligonukleotide wurden folgende Bedingungen verwendet:

Tabelle 34: Übersicht über die verwendeten HPLC-Gradienten und –säulen, sowie die Detektionswellenlängen zur Oligonukleotidreinigung. Erläuterungen: A = 50 mM NH₄OAc-Puffer (pH 6.5), B = MeCN

Sequenzen	Mod.	Säule	Gradient	Detektion
Bo-DNA1, Bo-DNA2	Bo	<i>Discovery[®] Bio Wide Pore C5</i>	0 – 45 % B (45 min.)	λ_{abs} = 260 nm, 290 nm, 530 nm
Bo-DNA3, BoDNA4	Bo	<i>Discovery[®] Bio Wide Pore C5</i>	0 - 70 % B (45 min.)	λ_{abs} = 260 nm, 290 nm, 530nm
M1-DNA1	M1	<i>Supelcosil LC- 318</i>	0 – 20 % B (40 min.)	λ_{abs} = 260 nm, 290 nm, 500 nm
M2-DNA1, M2-DNA2, M2-DNA3	M2	<i>Supelcosil LC- 318</i>	0 – 20% B (40 min.)	λ_{abs} = 260 nm, 290 nm, 540 nm
M3-DNA1, M3-DNA2, M3-DNA3	M3	<i>Supelcosil LC- 318</i>	0 – 20 % B (40 min.)	λ_{abs} = 260 nm, 290 nm, 580 nm
HQ5 – HQ10	HQ	<i>Supelcosil LC- 318</i>	0 – 20% B (40 min.)	λ_{abs} = 260 nm, 290 nm, 310 nm
Terp1 - Terp6	TerpdU	<i>Supelcosil LC- 318</i>	0 – 20% B (40 min.)	λ_{abs} = 260 nm, 290 nm, 330 nm
NR1 - NR6	NRdU	<i>Supelcosil LC- 318</i>	0 – 25 % B (40 min.)	λ_{abs} = 260 nm, 290 nm, 610 nm
DIMAPdU1, DIMAPdU2, DIMAP1- DIMAP6	DIMAPdU	<i>Supelcosil LC- 318</i>	0 – 20 % B (40 min.)	λ_{abs} = 260 nm, 290 nm, 350nm
DIMAPHQ1, DIMAPHQ2	DIMAPdU, HQ	<i>Supelcosil LC- 318</i>	0 – 25 % B (40 min.)	λ_{abs} = 260 nm, 290 nm, 350 nm
DAPHQ1, DAPHQ2	DAP ²⁺ , HQ	<i>Supelcosil LC- 318</i>	0 – 25 % B (40 min.)	λ_{abs} = 260 nm, 290 nm, 418 nm

9.3.4 Klickreaktion

Synthesevorschrift

Nach erfolgter Abspaltung von den CPG-Säulen werden die gefriergetrockneten DNA-Stränge mit je 25 μL (10 μmol) Natriumascorbat-Lösung (400 mM in Wasser), 34 μL (3.4 μmol) TBTA-Lösung (100 mM in DMSO/*t*BuOH 3:1), 17 μL (0.17 μmol) Tetrakis(acetonitril)kupfer(I)-hexafluorophosphat-Lösung (10 mM in DMSO/*t*BuOH 3:1) und 114 μL (1.14 μmol) einer Lösung des Azids (10 mM in DMSO/*t*BuOH 3:1) versetzt und 15 h bei RT geschüttelt. Anschließend wird das Lösungsmittel durch Gefriertrocknung entfernt, der Rückstand in 100 μL (0.15 mmol) Natriumacetat-Lösung (0.3 M in Wasser) und 1 mL EtOH aufgenommen und über Nacht bei $-38\text{ }^{\circ}\text{C}$ aufbewahrt. Nach Abzentrifugieren (15 min. bei 13000 rpm) wird der Überstand vorsichtig vom DNA-Pellet entfernt. Der Rückstand wird mit 1 mL EtOH (70 Vol-%) gewaschen, erneut abzentrifugiert (15 min. bei 13000 rpm) und der Überstand nochmals vorsichtig abpipettiert. Das DNA-Pellet wird anschließend im flüssigen Stickstoff ausgefroren, lyophilisiert und wieder in 500 μL Wasser aufgenommen.

Entsalzen

Um die DNA-Stränge über RP-HPLC zu reinigen, ist es notwendig, die Oligonukleotidstränge zunächst von überschüssigen Kupfersalzen zu befreien. Dazu werden *illustra NAP-5*-Säulen der Firma *GE-Healthcare* verwendet. Zuerst müssen die Säulen mit 10 mL eines 5 mM Ammoniumacetatpuffers equilibriert werden. Anschließend wird der entsprechende DNA-Strang in 500 μL Wasser aufgenommen und auf die Säule aufgetragen. Das Oligonukleotid wird mit 1 mL eines 5 mM Ammoniumacetatpuffers eluiert und zur Verringerung des Probenvolumens in flüssigem Stickstoff ausgefroren und lyophilisiert.

9.3.5 Aufarbeitung der HQ-Oligonukleotide

Die Aufarbeitung und Reinigung der mit HQ modifizierten Oligonukleotide erfolgt nach der allgemeinen Vorschrift. Allerdings wird dem bei der HPLC verwendeten 50 mM NH_4OAc -Puffer eine geringe Menge EDTA ($c = 0.1\text{ mM}$) zugesetzt um eine

Metallionenkontamination der Proben zu vermeiden. Nach erfolgter HPLC Trennung werden die Proben durch Entsalzung von überschüssigem ETDA befreit. Dazu werden *illustra NAP-5*-Säulen der Firma *GE-Healthcare* verwendet. Zuerst müssen die Säulen mit 10 mL eines 5 mM Ammoniumacetatpuffers equilibriert werden. Anschließend wird der entsprechende DNA-Strang in 100 μ L Wasser aufgenommen und auf die Säule aufgetragen. Das Oligonukleotid wird mit 5 mM Ammoniumacetatpuffer eluiert, wobei die ersten 400 μ L als Vorlauf verworfen werden und anschließend typischerweise 600 μ L als Produktfraktion gesammelt werden. Alle Fraktionen werden mittels UV/Vis-Messungen auf ihren Oligonukleotidgehalt überprüft. Zur Verringerung des Probenvolumens werden die Proben in flüssigem Stickstoff ausgefroren und lyophilisiert. Um sicher zu gehen, dass auch alle Reste von EDTA entfernt werden, wird die Entsalzung der Proben nochmals wiederholt.

9.3.6 Charakterisierung der Hybridisierung der Oligonukleotide

Charakterisierung der Oligonukleotide durch ESI-MS

ESI-Massenspektren von Oligonukleotiden wurden von der Betriebseinheit Zentrale Analytik, Massenspektrometrie der Universität Regensburg an einem *ThermoQuest Finnigan TSQ 7000* im negativen Ionisierungsmodus aufgenommen.

Konzentrationsbestimmung

Die Konzentration der DNA-Stammlösungen wurde aus dem *Lambert-Beerschen Gesetz* über die optische Dichte bei $\lambda_{\text{abs}} = 260 \text{ nm}$ bestimmt.^[399] Der Extinktionskoeffizient ε_{260} eines unmodifizierten DNA-Strangs in Wasser kann über folgende Formel berechnet werden:

$$\varepsilon_{260} = (A \cdot \varepsilon_A + C \cdot \varepsilon_C + G \cdot \varepsilon_G + T \cdot \varepsilon_T) \cdot 0.9$$

Dabei steht A, C, G und T für die Anzahl der entsprechenden Nucleobasen, ε beschreibt die Extinktionskoeffizienten der einzelnen DNA-Basen bei $\lambda = 260 \text{ nm}$. Der Faktor 0.9 berücksichtigt die Hypochromizität. Zur Konzentrationsbestimmung modifizierter Oligonukleotide muss der entsprechende Extinktionskoeffizient der Modifikationen addiert werden.

Tabelle 35: Molare Extinktionskoeffizienten der natürlichen und modifizierten Nukleoside

natürliche Nukleoside	Extinktionskoeffizient nt $\epsilon_{260} [\text{mM}^{-1} \text{cm}^{-1}]$	modifizierte Nukleoside	Extinktionskoeffizient nt $\epsilon_{260} [\text{mM}^{-1} \text{cm}^{-1}]$
A	15.4	M1	8.5
C	7.3	M2	4.6
G	11.7	M3	13.0
T	8.8	Bo	4.2
		BodU	11.9
		HQ	1.5
		TerpdU	15.9
		DIMAPdU	36.2
		NRdU	28.0
		In	9.0
		DAP ²⁺	23.4

Hybridisierung

Der modifizierte Einzelstrang wird zusammen mit 1.2 eq. des komplementären Gegenstrangs in 10 mM Natriumphosphatpuffer (Na-P_i) für 10 min auf 90 °C erhitzt und anschließend langsam auf RT abgekühlt. Im Falle einer Hybridisierung zweier modifizierter Oligonukleotide wird je ein Äquivalent beider Stränge verwendet.

9.4 Untersuchungen an mit Hydroxychinolin oder Terpyridin modifizierten Oligonukleotiden

Messungen mit hydroxychinolinmodifizierten Oligonukleotiden

Die HQ-Oligonukleotide wurden jeweils vor der Hybridisierung mit der entsprechenden Metallsalzlösung bzw. EDTA (4eq.) versetzt. Es wurden jeweils frisch hergestellte 100 μM Lösungen von CuCl₂ bzw. KAuCl₄ verwendet. Je nach Anzahl der HQ-Modifikationen wurden folgende Äquivalente an Metallsalz verwendet:

1 HQ-Basenpaar: 1.5 eq.

2 HQ-Basenpaare: 3.0 eq.

3 HQ-Basenpaare: 4.0 eq.

Die Schmelztemperaturmessungen wurden nach dem Standardprotokoll durchgeführt. Allerdings wurde die Schmelztemperatur nur anhand des bei der Dehybridisierung („beim Aufheizen“) erhaltenen Wertes bestimmt.

Titrationsexperimente mit terpyridinmodifizierten Oligonukleotiden

Vor den Titrationsexperimenten wurden die jeweiligen Duplexe in Abwesenheit von Metallionen hybridisiert. Als Metallsalzlösungen wurden jeweils frisch hergestellte 200 μM Lösungen von CuCl_2 , NiCl_2 , ZnCl_2 und FeCl_2 in Millipore-Wasser verwendet. Durch die relativ hohe Konzentration der Salzlösungen bleibt der Verdünnungsfaktor während der Titrationen vernachlässigbar gering. Zwischen den einzelnen Titrationsschritten wurden jeweils 90 min gewartet um eine ausreichende Komplexierung zu ermöglichen. Folgende Tabellen geben die Zugabe an Salzlösung für die einzelnen Titrationsschritte wieder:

Terp 1 und Terp3	
Zugabe M^{2+}Cl_2 [μL]	Gesamt M^{2+}Cl_2 [μL]
+ 1.25	1.25 (0.1 eq.)
+ 1.88	3.13 (0.25 eq.)
+ 3.12	6.25 (0.5 eq.)
+ 3.13	9.38 (0.75 eq.)
+ 3.12	12.5 (1.0 eq.)
+ 6.25	18.75 (1.5 eq.)

Terp1/Terp2 und Terp3/Terp4	
Zugabe M^{2+}Cl_2 [μL]	Gesamt M^{2+}Cl_2 [μL]
+ 2.50	2.50 (0.2 eq.)
+ 3.75	6.25 (0.5 eq.)
+ 6.25	12.5 (1.0 eq.)
+ 6.25	18.75 (1.5 eq.)
+ 6.25	25.0 (2.0 eq.)
+ 12.5	37.5 (3.0 eq.)

Für die Gelelektrophorese-Experimente wurden nicht-denaturierende 8%ige SB Whatman-Gele (Natriumborat-Puffer, pH 8) verwendet. Es wurde ein EDTA-freier Ladepuffer verwendet. Die Spannung während der Elektrophorese betrug 250 V. Als Referenz dienten bei den Gel-Experimenten mit EDTA ($c = 100\mu\text{M}$) versetzte Proben ohne Metallsalz. Die Proben wurden vor dem Aufbringen auf die Gele mit Gel Star[®] - Fluoreszenzmarker versetzt um eine Fluoreszenzdetektion zu ermöglichen. Da die Fluoreszenzdetektion weniger sensitiv und relativ störungsanfällig ist wurde zusätzlich noch eine Silberfärbung der Gele vorgenommen.

10 Literaturverzeichnis

- [1] O. T. Avery, C. M. MacLeod, M. McCarty, *J. Exp. Med.* **1944**, 79, 137-158.
- [2] J. D. Watson, F. H. C. Crick, *Nature* **1953**, 171, 737-738.
- [3] C. C. Mello, D. Conte, *Nature* **2004**, 431, 338-342.
- [4] N. C. Seeman, *Nature* **2003**, 421, 427-431.
- [5] P. W. K. Rothemund, *Nature* **2006**, 440, 297-302.
- [6] F. A. Aldaye, A. L. Palmer, H. F. Sleiman, *Science* **2008**, 321, 1795-1799.
- [7] J. Bath, A. J. Turberfield, *Nature Nanotech.* **2007**, 2, 275-284.
- [8] G. Seelig, D. Soloveichik, D. Y. Zhang, E. Winfree, *Science* **2006**, 314, 1585-1588.
- [9] B. Giese, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2002**, 6, 612-618.
- [10] F. D. Lewis, X. Liu, J. Liu, S. E. Miller, R. T. Hayes, M. R. Wasielewski, *Nature* **2000**, 406, 51-53.
- [11] D. Porath, A. Bezryadin, S. d. Vries, C. Dekker, *Nature* **2000**, 403, 635-638.
- [12] S. O. Kelley, J. K. Barton, *Science* **1999**, 283, 375-381.
- [13] H.-A. Wagenknecht, *Nat. Prod. Rep.* **2006**, 23, 974-1006.
- [14] M. Kasha, *Discussions of the Faraday Society* **1950**, 9, 14-19.
- [15] G. G. Stokes, *Philosophical Transactions of the Royal Society of London* **1852**, 142, 463.
- [16] J. N. Demas, G. A. Crosby, *J. Phys. Chem.* **1971**, 75, 991-1024.
- [17] T. Förster, *Annalen der Physik* **1948**, 6, 55-75.
- [18] S. Laib, S. Seeger, *J. Fluoresc.* **2004**, 14, 187-191.
- [19] K. Börjesson, S. Preus, A. H. El-Sagheer, T. Brown, B. Albinsson, L. M. Wilhelmsson, *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, 131, 4288-4293.
- [20] T. Strube, O. Schiemann, F. MacMillan, T. Prisner, J. W. Engels, *Nucleosides, Nucleotides & Nucleic Acids* **2001**, 20, 1271-1274.
- [21] O. Schiemann, N. Piton, J. Plackmeyer, B. E. Bode, T. F. Prisner, J. W. Engels, *Nature Protocols* **2007**, 2, 904-923.
- [22] Y. Takezawa, W. Maeda, K. Tanaka, M. Shionoya, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, 48, 1081-1084.
- [23] G. H. Clever, M. Shionoya, *Coord. Chem. Rev.* **2010**, 254, 2391-2402.

- [24] H. A. Wagenknecht, *Fluorescence Methods and Applications: Spectroscopy, Imaging, and Probes* **2008**, 1130, 122-130.
- [25] L. M. Wilhelmsson, *Quart. Rev. Biophys.* **2010**, 43, 159-183.
- [26] F. D. Lewis, R. L. Letsinger, *J. Biol. Inorg. Chem.* **1998**, 3, 215-221.
- [27] F. D. Lewis, L. G. Zhang, R. F. Kelley, D. McCamant, M. R. Wasielewski, *Tetrahedron* **2007**, 63, 3457-3464.
- [28] S. H. Weisbrod, A. Marx, *Chem. Commun.* **2008**, 5675-5685.
- [29] D. S. Jones, P. A. Barstad, M. J. Feild, J. P. Hachmann, M. S. Hayag, K. W. Hill, G. M. Iverson, D. A. Livingston, M. S. Palanki, A. R. Tibbetts, L. Yu, S. M. Coutts, *J. Med. Chem.* **1995**, 38, 2138-2144.
- [30] D. S. Jones, J. P. Hachmann, S. A. Osgood, M. S. Hayag, P. A. Barstad, G. M. Iverson, S. M. Coutts, *Bioconjugate Chem.* **1994**, 5, 390-399.
- [31] S. S. Ghosh, P. M. Kao, A. W. Mccue, H. L. Chappelle, *Bioconjugate Chem.* **1990**, 1, 71-76.
- [32] S. B. Rajur, C. M. Roth, J. R. Morgan, M. L. Yarmush, *Bioconjugate Chem.* **1997**, 8, 935-940.
- [33] B. Bornemann, S. P. Liu, A. Erbe, E. Scheer, A. Marx, *Chemphyschem* **2008**, 9, 1241-1244.
- [34] D. C. Rideout, R. Breslow, *J. Am. Chem. Soc.* **1980**, 102, 7816-7817.
- [35] S. Otto, F. Bertoncin, J. B. F. N. Engberts, *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, 118, 7702-7707.
- [36] D. Graham, A. Enright, *Curr. Org. Synth.* **2006**, 3, 9-17.
- [37] K. Maeda, C. Finnie, B. Svensson, *Biochem. J.* **2004**, 378, 497-507.
- [38] O. H. Griffith, H. M. Mcconnel, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1966**, 55, 8-11.
- [39] B. de Bruin, B. Kuhnast, F. Hinnen, L. Yaouancq, M. Amessou, L. Johannes, A. Samson, R. Boisgard, B. Tavitian, F. Dolle, *Bioconjugate Chem.* **2005**, 16, 406-420.
- [40] K. DiGleria, H. A. O. Hill, L. L. Wong, *Febs Lett.* **1996**, 390, 142-144.
- [41] B. Seelig, A. Jaschke, *Chemistry & Biology* **1999**, 6, (3), 167-176.
- [42] T. M. Tarasow, S. L. Tarasow, B. E. Eaton, *Nature* **1997**, 389, 54-57.
- [43] K. W. Hill, J. Taunton-Rigby, J. D. Carter, E. Kropp, K. Vagle, W. Pieken, D. P. C. McGee, G. M. Husar, M. Leuck, D. J. Anziano, D. P. Sebesta, *J. Org. Chem.* **2001**, 66, 5352-5358.

-
- [44] G. M. Husar, D. J. Anziano, M. Leuck, D. P. Sebesta, *Nucleosides Nucleotides & Nucleic Acids* **2001**, 20, 559-566.
- [45] H. A. Latham-Timmons, A. Wolter, J. S. Roach, R. Giare, M. Leuck, *Nucleosides Nucleotides & Nucleic Acids* **2003**, 22, (5-8), 1495-1497.
- [46] D. Graham, A. Grondin, C. McHugh, L. Fruk, W. E. Smith, *Tetrahedron Letters* **2002**, 43, (27), 4785-4788.
- [47] A. Okamoto, T. Taiji, K. Tainaka, I. Saito, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2002**, 12, 1895-1896.
- [48] R. Huisgen, *Angew. Chem. Int. Ed.* **1962**, 2, 565-598.
- [49] V. V. Rostovstev, L. G. Green, V. V. Fokin, K. B. Sharpless, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2002**, 41, 2596-2599.
- [50] Q. Wang, T. R. Chan, R. Hilgraf, V. V. Fokin, K. B. Sharpless, M. G. Finn, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, 125, 3192-3193.
- [51] H. C. Kolb, M. G. Finn, K. B. Sharpless, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2001**, 40, 2004-2021.
- [52] M. G. Finn, H. C. Kolb, V. V. Fokin, K. B. Sharpless, *Prog. Chem.* **2008**, 20, 1-4.
- [53] J. E. Moses, A. D. Moorhouse, *Chem. Soc. Rev.* **2007**, 36, 1249-1262.
- [54] T. S. Seo, Z. M. Li, H. Ruparel, J. Y. Ju, *J. Org. Chem.* **2003**, 68, 609-612.
- [55] R. L. Weller, S. R. Rajski, *Org. Lett.* **2005**, 7, 2141-2144.
- [56] C. J. Burrows, J. G. Muller, *Chem. Rev.* **1998**, 98, 1109-1151.
- [57] J. Gierlich, G. A. Burley, P. M. E. Gramlich, D. M. Hammond, T. Carell, *Org. Lett.* **2006**, 8, 3639-3642.
- [58] F. Seela, V. R. Sirivolu, *Chemistry & Biodiversity* **2006**, 3, 509-514.
- [59] F. Seela, V. R. Sirivolu, P. Chittepu, *Bioconjugate Chem.* **2008**, 19, 211-224.
- [60] P. M. Gramlich, C. T. Wirges, A. Manetto, T. Carell, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, 47, 8350-8358.
- [61] T. Ehrenschwender, B. R. Varga, P. Kele, H. A. Wagenknecht, *Chem. Asian J.* **2010**, 5, 1761-1764.
- [62] S. Berndt, N. Herzig, P. Kele, D. Lachmann, X. Li, O. S. Wolfbeis, H.-A. Wagenknecht, *Bioconjugate Chem.* **2009**, 20, 558-564.
- [63] C. Beyer, H. A. Wagenknecht, *Chem. Commun.* **2010**, 46, 2230-2231.

- [64] K. Gogoi, M. V. Mane, S. S. Kunte, V. A. Kumar, *Nucleic Acids Research* **2007**, 35, (21), e139.
- [65] M. Fischler, A. Sologubenko, G. Clever, G. Burley, J. Gierlich, T. Carell, U. Simon, *Chem. Commun.* **2008**, 169-171.
- [66] M. Fischler, U. Simon, H. Nir, Y. Eichen, G. A. Burley, J. Gierlich, P. M. E. Gramlich, T. Carell, *Small* **2007**, 3, 1049-1055.
- [67] J. Lietard, A. Meyer, J. J. Vasseur, F. Morvan, *J. Org. Chem.* **2008**, 73, 191-200.
- [68] R. Kumar, A. El-Sagheer, J. Tumpane, P. Lincoln, L. M. Wilhelmsson, T. Brown, *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, 129, 6859-6864.
- [69] D. I. Rozkiewicz, J. Gierlich, G. A. Burley, K. Gutschiedl, T. Carell, B. J. Ravoo, D. N. Reinhoudt, *ChemBiochem* **2007**, 8, (16), 1997-2002.
- [70] D. D. Eley, R. B. Leslie, *Nature* **1963**, 197, 898.
- [71] S. Priyadarshy, S. M. Risser, D. N. Beratan, *J. Phys. Chem.* **1996**, 100, 17678-17682.
- [72] N. J. Turro, J. K. Barton, *J. Biol. Inorg. Chem.* **1998**, 3, 201-209.
- [73] Y. A. Berlin, A. L. Burin, M. A. Ratner, *Superlattices Microstructures* **2000**, 28, 241-252.
- [74] R. L. Letsinger, V. Mahadevan, *J. Am. Chem. Soc.* **1965**, 87, 3526-3527.
- [75] S. L. Beaucage, M. H. Caruthers, *Tetrahedron Lett.* **1981**, 22, 1859-1862.
- [76] M. H. Caruthers, A. D. Barone, S. L. Beaucage, D. R. Dodds, E. F. Fisher, L. J. McBride, M. Matteucci, Z. Stabinsky, J.-Y. Tang, *Meth. Enzymol.* **1987**, 154, 287-313.
- [77] C. J. Murphy, M. R. Arkin, Y. Jenkins, N. D. Ghatlia, S. H. Bossmann, N. J. Turro, J. K. Barton, *Science* **1993**, 262, 1025-1029.
- [78] C. J. A. Murphy, M.R.; Jenkins, J.; Ghatlia, N.D.; Bossmann, S.H.; Turro, N.J.; Barton, J.K., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1994**, 91, 5315.
- [79] J. Jortner, M. Bixon, T. Langenbacher, M. Michel-Beyerle, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1998**, 95, 12759-12765.
- [80] P. O'Neill, M. Fielden, *Adv. Radiation Biol.* **1993**, 17, 53-120.
- [81] J. H. J. Hoeijmakers, *Nature* **2001**, 411, 366-374.
- [82] D. Wang, D. A. Kreutzer, J. M. Essigmann, *Mutation Res.* **1998**, 400, 99-115.

-
- [83] T. G. Drummond, M. G. Hill, J. K. Barton, *Nature Biotechnol.* **2003**, *21*, 1192-1199.
- [84] D. Porath, G. Cuniberti, R. D. Felice, *Top. Curr. Chem.* **2004**, *237*, 183-227.
- [85] F. D. Lewis, H. Zhu, P. Daublain, T. Fiebig, M. Raytchev, Q. Wang, V. Shafirovich, *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 791-800.
- [86] R. A. Marcus, N. Sutin, *Biochim. Biophys. Acta* **1985**, *811*, 265-322.
- [87] Y. A. Berlin, F. C. Grozema, L. D. A. Siebbeles, M. A. Ratner, *J. Phys. Chem. C* **2008**, *112*, 10988-11000.
- [88] J. Genereux, J. K. Barton, *Chem. Rev.* **2010**, *110*, 1642-1662.
- [89] E. Meggers, M. E. Michel-Beyerle, B. Giese, *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *120*, 12950-12955.
- [90] C. A. M. Seidel, A. Schulz, M. H. M. Sauer, *J. Phys. Chem.* **1996**, *100*, 5541-5553.
- [91] S. Steenken, S. V. Jovanovic, *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*, 617-618.
- [92] B. Giese, M. Spichthy, *ChemPhysChem* **2000**, *1*, 195-198.
- [93] B. Giese, J. Amaudrut, A.-K. Köhler, M. Spormann, S. Wessely, *Nature* **2001**, *412*, 318-320.
- [94] T. Takada, K. Kawai, X. Cai, A. Sugimoto, M. Fujitsuka, T. Majima, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 1125-1129.
- [95] B. Giese, *Annu. Rev. Biochem.* **2002**, *71*, 51-70.
- [96] R. Huber, T. Fiebig, H.-A. Wagenknecht, *Chem. Commun.* **2003**, 1878-1879.
- [97] M. Raytchev, E. Mayer, N. Amann, H.-A. Wagenknecht, T. Fiebig, *ChemPhysChem* **2004**, *5*, 706-712.
- [98] G. G. C. Endres, D. L.; Singh, R. R. P., *Rev. Mod. Phys.* **2004**, *76*, 195.
- [99] F. H. Chen, J.; Huang, Z.; Li, X.; Tao, N. J., *Annu. Rev. Phys. Chem.* **2007**, *58*, 535.
- [100] K.-H. Müller, *Phys. Rev. B* **2006**, *73*, 45403.
- [101] T. Tada, M. Kondo, K. Yoshizawa, *ChemPhysChem* **2003**, *4*, 1256-1260.
- [102] K. E. Augustyn, J. C. Genereux, J. K. Barton, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2007**, *46*, 5731-5733.
- [103] A. A. Gorodetsky, O. Green, E. Yavin, J. K. Barton, *Bioconjugate Chem.* **2007**, *18*, 1434-1441.

- [104] X. Guo, A. A. Gorodetsky, J. Hone, J. K. Barton, C. Nuckolls, *Nature Nanotechnol.* **2008**, 3, 163-167.
- [105] H. Cohen, C. Nogues, R. Naaman, D. Porath, *Proc. Natl. Sci. U.S.A.* **2005**, 102, 11589.
- [106] B. Xu, P. Zhang, X. Li, N. Tao, *Nano Lett.* **2004**, 4, 1105.
- [107] M. C. Buzzeo, J. K. Barton, *Bioconjugate Chem.* **2008**, 19, 2110-2112.
- [108] A. K. Boal, J. K. Barton, *Bioconjugate Chem.* **2005**, 16, 312-321.
- [109] T. Takada, M. Fujitsuka, T. Majima, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2007**, 104, 11179.
- [110] A. Okamoto, T. Kamei, I. Saito, *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, 126, 658-662.
- [111] M. A. O'Neill, H.-C. Becker, C. Wan, J. K. Barton, A. H. Zewail, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2003**, 42, 5896-5900.
- [112] L. Valis, N. Amann, H.-A. Wagenknecht, *Org. Biomol. Chem.* **2005**, 3, 36-38.
- [113] F. C. Grozema, S. Tonzani, Y. A. Berlin, G. C. Schatz, L. D. A. Siebbeles, M. A. Ratner, *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, 130, 5157-5166.
- [114] M. A. O'Neill, J. K. Barton, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, 126, 11471-11483.
- [115] C. Wan, T. Fiebig, S. O. Kelley, C. Treadway, J. K. Barton, A. H. Zewail, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1999**, 96, 6014-6019.
- [116] L. Valis, Q. Wang, M. Raytchev, I. Buchvarov, H.-A. Wagenknecht, T. Fiebig, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2006**, 103, 10192-10195.
- [117] C. Dohno, A. Ogawa, K. Nakatani, I. Saito, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, 125, 10154-10155.
- [118] C. Dohno, E. D. A. Stemp, J. K. Barton, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, 125, 9586-9587.
- [119] K. Kawai, Y. Osakada, T. Takada, M. Fujitsuka, T. Majima, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, 126, 12843-12846.
- [120] K. Kawai, Y. Osakada, M. Fujitsuka, T. Majima, *Chem. Eur. J.* **2008**, 14, 3721-3726.
- [121] K. Kawai, T. Takada, T. Nagai, X. Cai, A. Sugimoto, M. Fujisaku, T. Majima, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, 125, 16198-16199.
- [122] K. Kawai, Y. Osakada, M. Fujisaku, T. Majima, *J. Phys. Chem. B* **2008**, 112, 2144.

-
- [123] M. R. Arkin, E. D. A. Stemp, R. E. Holmlin, J. K. Barton, A. Hörmann, E. J. C. Olson, P. F. Barbara, *Science* **1996**, 273, 475-480.
- [124] S. O. Kelley, R. E. Holmlin, E. D. A. Stemp, J. K. Barton, *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, 119, 9861-9870.
- [125] C. Wan, T. Fiebig, O. Schiemann, J. K. Barton, A. H. Zewail, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2000**, 97, 14052-14055.
- [126] F. D. Lewis, T. Wu, Y. Zhang, R. L. Letsinger, S. R. Greenfield, M. R. Wasielewski, *Science* **1997**, 277, 673-676.
- [127] M. H. V. Huynh, T. J. Meyer, *Chem. Rev.* **2007**, 107, 5004-5064.
- [128] S. Steenken, *Chem. Rev.* **1989**, 89, 503-520.
- [129] A. Kumar, M. D. Sevilla, *Chem. Rev.* **2010**, 110, 7002-7023.
- [130] J. Bertran, A. Oliva, L. Rodriguez-Santiago, M. Sodupe, *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, 120, 8159-8167.
- [131] H.-A. Wagenknecht, *Curr. Org. Chem.* **2004**, 8, 251-266.
- [132] A. Weller, *Z. Phys. Chem.* **1982**, 133, 93-98.
- [133] K. Kumar, I. V. Kurnikov, D. N. Beratan, D. H. Waldeck, M. B. Zimmt, *J. Phys. Chem. A* **1998**, 102, 5529-5541.
- [134] T. G. Drummond, M. G. Hill, J. K. Barton, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, 126, 15010-15011.
- [135] N. Amann, R. Huber, H.-A. Wagenknecht, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2004**, 43, 1845-1847.
- [136] C. Prunkl, S. Berndl, C. Wanninger-Weiß, J. Barbaric, H.-A. Wagenknecht, *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2010**, 12, 32-43.
- [137] C. Behrens, L. T. Burgdorf, A. Schwögler, T. Carell, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2002**, 41, 1763-1766.
- [138] C. Haas, K. Kräling, M. Cichon, N. Rahe, T. Carell, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2004**, 43, 1842-1844.
- [139] T. Ito, S. E. Rokita, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2004**, 43, 1839-1842.
- [140] C. Wagner, H.-A. Wagenknecht, *Chem. Eur. J.* **2005**, 11, 1871-1876.
- [141] M. Tanaka, B. Elias, J. K. Barton, *J. Org. Chem.* **2010**, 75, 2423-2428.
- [142] R. v. G. Berera, R.; Kennis, J.T.M., *Photosynth. Res.* **2009**, 101, 105-108.
- [143] P. Fromherz, B. Rieger, *J. Am. Chem. Soc.* **1986**, 108, 5361-5362.
- [144] A. M. Brun, A. Harriman, *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, 114, 3656-3660.

- [145] R. E. Holmlin, P. J. Dandliker, J. K. Barton, *Angew. Chem. Int. Ed.* **1997**, 36, 2714-2730.
- [146] M. A. O'Neill, J. K. Barton, *Top. Curr. Chem.* **2004**, 236, 67-115.
- [147] M. A. O'Neill, J. K. Barton, Sequence-dependent DNA Dynamics: The Regulator of DNA-mediated Charge Transport. In *Charge Transfer in DNA - From Mechanism to Application*, Hrsg. H.-A. Wagenknecht, Wiley-VCH: Weinheim, 2005; pp 27-76.
- [148] T. J. Meade, J. F. Kaysyem, *Angew. Chem. Int. Ed.* **1995**, 34, 352-354.
- [149] K. Fukui, K. Tanaka, *Angew. Chem. Int. Ed.* **1998**, 37, 158-161.
- [150] K. Kino, I. Saito, *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, 120, 7373-7374.
- [151] H. Ikeda, I. Saito, *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, 121, 10836-10837.
- [152] K. Nakatani, I. Saito, *Top. Curr. Chem.* **2004**, 236, 163-186.
- [153] D. Ly, L. Sanii, G. B. Schuster, *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, 121, 9400-9410.
- [154] V. Shafirovich, A. Dourandin, W. Huang, N. P. Luneva, N. E. Geacintov, *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2000**, 2, 4399-4408.
- [155] G. B. Schuster, *Acc. Chem. Res.* **2000**, 33, 253-260.
- [156] S. Hess, M. Götz, W. B. Davis, M.-E. Michel-Beyerle, *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, 123, 10046-10055.
- [157] K. Kawai, T. Takada, S. Tojo, T. Majima, *Tetrahedron Letters* **2002**, 43, 89-91.
- [158] K. Nakatani, C. Dohno, I. Saito, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, 124, 6802-6803.
- [159] M. Pascaly, J. Yoo, J. K. Barton, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, 124, 9083-9092.
- [160] C.-S. Liu, R. Hernandez, G. B. Schuster, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, 126, 2877-2884.
- [161] F. Shao, M. A. O'Neill, J. K. Barton, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2004**, 101, 17914-17919.
- [162] F. D. Lewis, Y. Wu, L. Zhang, X. Zuo, R. T. Hayes, M. R. Wasielewski, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, 126, 8206-8215.
- [163] L. Valis, Q. Wang, M. Raytchev, I. Buchvarov, H.-A. Wagenknecht, T. Fiebig, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2006**, 103, 10192-10195.
- [164] K. Kawai, Y. Osakada, E. Matsutani, T. Majima, *J. Phys. Chem. B* **2010**, 114, 10195-10199.
- [165] Z. Cai, Z. Gu, M. D. Sevilla, *J. Phys. Chem. B* **2000**, 104, 10406-10411.
- [166] Z. Cai, M. D. Sevilla, *J. Phys. Chem. B* **2000**, 104, 6942-6949.

-
- [167] A. Messer, K. Carpenter, K. Forzley, J. Buchanan, S. Yang, Y. Razskazovskii, Z. Cai, M. D. Sevilla, *J. Phys. Chem. B* **2000**, *104*, 1128-1136.
- [168] Z. Cai, X. Li, M. D. Sevilla, *J. Phys. Chem. B* **2002**, *106*, 2755-2762.
- [169] Y. Razskazovskii, S. G. Swarts, J. M. Falcone, C. Taylor, M. D. Sevilla, *J. Phys. Chem. B* **1997**, *101*, 1460-1467.
- [170] Z. Cai, Z. Gu, M. D. Sevilla, *J. Phys. Chem. B* **2001**, *105*, 6031-6041.
- [171] R. F. Anderson, G. A. Wright, *Phys. Chem. Chem. Phys.* **1999**, *1*, 4827-4831.
- [172] M. G. Debije, M. T. Milano, W. A. Bernhard, *Angew. Chem. Int. Ed.* **1999**, *38*, 2752-2756.
- [173] Z. Cai, M. D. Sevilla, *Top. Curr. Chem.* **2004**, *237*, 103-127.
- [174] T. Ito, S. E. Rokita, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 11480-11481.
- [175] F. D. Lewis, X. Liu, S. E. Miller, R. T. Hayes, M. R. Wasielewski, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 11280-11281.
- [176] O. Schiemann, E. Feresin, T. Carl, B. Giese, *ChemPhysChem* **2004**, *5*, 270-274.
- [177] B. Giese, B. Carl, T. Carl, T. Carell, C. Behrens, U. Hennecke, O. Schiemann, E. Feresin, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2004**, *43*, 1848-1851.
- [178] N. Amann, E. Pandurski, T. Fiebig, H.-A. Wagenknecht, *Chem. Eur. J.* **2002**, *8*, 4877-4883.
- [179] P. Kaden, E. Mayer-Enthart, A. Trifonov, T. Fiebig, H.-A. Wagenknecht, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, *44*, 1637-1639.
- [180] C. Wanninger-Weiß, H.-A. Wagenknecht, *Eur. J. Org. Chem.* **2008**, 64-71.
- [181] L. T. Burgdorf, T. Carell, *Chem. Eur. J.* **2002**, *8*, 293-301.
- [182] T. Schultz, E. Samoylova, W. Radloff, I. V. Hertel, A. L. Sobolewski, W. Domcke, *Science* **2004**, *306*, 1765-1793.
- [183] J. Peon, A. H. Zewail, *Chem. Phys. Lett.* **2001**, *348*, 255-262.
- [184] L. Serrano-Andres, M. Merchan, *J. Photoch. Photobio. C-Photochem. Rev.* **2009**, *10*, 21-32.
- [185] R. W. Sinkeldam, N. J. Greco, Y. Tor, *Chem. Rev.* **2010**, *110*, 2579-2619.
- [186] S. Tyagi, D. P. Bratu, F. R. Kramer, *Nature Biotechnol.* **1998**, *16*, 49-53.
- [187] V. G. Cheung, J. P. Gregg, K. J. Gogolin-Ewens, J. Bandong, C. A. Stanley, L. Baker, M. J. Higgins, N. J. Nowak, T. B. Shows, W. J. Ewens, R. S. Spielman, *Nature Genetics* **1998**, *18*, 225-230.

- [188] A. Okamoto, K. Tanaka, T. Fukuta, I. Saito, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, 125, 9296-9297.
- [189] A. Okamoto, K. Tainaka, I. Saito, *Chem. Lett.* **2003**, 32, 684-685.
- [190] A. Okamoto, Y. Saito, I. Saito, *J. Photochem. Photobiol. C: Photochem. Rev.* **2005**, 6, 108-122.
- [191] K. Wang, Z. Tang, C. J. Yang, Y. Kim, X. Fang, W. Li, Y. Wu, C. D. Medley, Z. Cao, J. Li, P. Colon, H. Lin, W. Tan, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, 48, 856-870.
- [192] G. M. Blackburn, M. J. Gait, *Nucleic acids in chemistry and biology 2nd ed.* Oxford University Press: Oxford, England: New York, 1996.
- [193] R. Weissleder, C. H. Tung, U. Mahmood, A. Bogdanov, *Nature Biotechn.* **1999**, 17, 375-378.
- [194] P. Kele, X. Li, M. Link, K. Nagy, A. Herner, K. Lörincz, S. Beni, O. S. Wolfbeis, *Org. Biomol. Chem.* **2009**, 7, 3486-3490.
- [195] K. Nagy, E. Orban, S. Bosze, P. Kele, *Chem. Asian J.* **2010**, 5, 773-777.
- [196] M. Grotli, M. Douglas, R. Eritja, B. S. Sproat, *Tetrahedron* **1998**, 54, 5899-5914.
- [197] C. Peters, A. Billich, M. Ghobrial, K. Hogenauer, T. Ullrich, P. Nussbaumer, *J. Org. Chem.* **2007**, 72, 1842-1845.
- [198] M.-c. Yee, S. C. Fas, M. M. Stohlmeyer, T. J. Wandless, K. A. Cimprich, *J. Biol. Chem.* **2005**, 280, 29053-29059.
- [199] J. Karolin, L. B.-A. Johansson, L. Strandberg, T. Ny, *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, 116, 7801-7806.
- [200] I. D. Johnson, H. C. Kang, R. P. Haugland, *Anal. Biochem.* **1991**, 198, 228-237.
- [201] C. G. Ferguson, C. S. Bigman, R. D. Richardson, L. A. v. Meeteren, W. H. Moolenaar, G. D. Prestwich, *Org. Lett.* **2006**, 8, 2023-2026.
- [202] G. Ulrich, R. Ziessel, A. Harriman, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, 47, 1184-1201.
- [203] A. Loudet, K. Burgess, *Chem. Rev.* **2007**, 107, 4891-4932.
- [204] M. Kollmannsberger, T. Gareis, S. Heini, J. Breu, J. Daub, *Angew. Chem. Int. Ed.* **1997**, 36, 1333-1335.

-
- [205] C. Trieflinger, K. Rurack, J. Daub, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, *45*, 2288-2291.
- [206] C.-W. Wan, A. Burghart, J. Chen, F. Bergström, L. B.-A. Johansson, M. F. Welford, T. G. Kim, M. R. Topp, R. M. Hochstrasser, K. Burgess, *Chem. Eur. J.* **2003**, *9*, 4430-4441.
- [207] Y. Gabe, T. Ueno, Y. Urano, H. Kojima, T. Nagano, *Anal. Bioanal. Chem.* **2006**, *386*, 621-626.
- [208] B. R. Sculimbrene, B. Imperiali, *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 7346-7352.
- [209] A. S. Worthington, M. D. Burkart, *Org. Biomol. Chem.* **2006**, *4*, 44-46.
- [210] Z. M. Li, X. P. Bai, H. Ruparel, S. Kim, N. J. Turro, J. Y. Ju, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2003**, *100*, 414-419.
- [211] Y. G. Li, Y. T. H. Cu, D. Luo, *Nature Biotechnol.* **2005**, *23*, 885-889.
- [212] L. Bi, D. H. Kim, J. Ju, *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 2542-2543.
- [213] M. Cornelius, C. G. C. T. Wörth, H.-C. Kliem, M. Wiessler, H. H. Schmeiser, *Electrophoresis* **2005**, *26*, 2591-2598.
- [214] Q. Meng, D. H. Kim, X. Bai, L. Bi, N. J. Turro, J. Ju, *J. Org. Chem.* **2006**, *71*, 3248-3252.
- [215] T. S. Seo, X. Bai, D. H. Kim, Q. Meng, S. Shi, H. Ruparel, Z. Li, N. J. Turro, J. Ju, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2005**, *102*, 5926-5931.
- [216] T. Ehrenschwender, H.-A. Wagenknecht, *Synthesis* **2008**, 3657-3662.
- [217] C. Wanninger-Weiß, F. D. Pasquale, T. Ehrenschwender, A. Marx, H.-A. Wagenknecht, *Chem. Commun.* **2008**, 1443-1445.
- [218] T. Ehrenschwender, *Diplmarbeit*. Universität Regensburg, 2008.
- [219] Z. R. Grabowski, K. Rotkiewicz, W. Rettig, *Chem. Rev.* **2003**, *103*, 3899-4031.
- [220] R. R. Hu, E. Lager, A. Aguilar-Aguilar, J. Z. Liu, J. W. Y. Lam, H. H. Y. Sung, I. D. Williams, Y. C. Zhong, K. S. Wong, E. Pena-Cabrera, B. Z. Tang, *J. Phys. Chem. C* **2009**, *113*, 15845-15853.
- [221] H. Sunahara, Y. Urano, H. Kojima, T. Nagano, *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 5597-5604.
- [222] C. Wagner, H.-A. Wagenknecht, *Org. Biomol. Chem.* **2008**, *6*, 48-50.
- [223] C. Wagner, H.-A. Wagenknecht, *Org. Lett.* **2006**, *8*, 4191-4194.
- [224] R. Huber, N. Amann, H.-A. Wagenknecht, *J. Org. Chem.* **2004**, *69*, 744-751.

- [225] C. Holzhauser, S. Berndl, F. Menacher, M. Breunig, A. Gopferich, H. A. Wagenknecht, *Eur. J. Org. Chem* **2010**, 1239-1248.
- [226] C. Sirichaiwat, C. Intaraudom, S. Kamchonwongpaisan, J. Vanichtanankul, Y. Thebtaranonth, Y. Yuthavong, *J. Med.Chem.* **2004**, 47, 345-354.
- [227] A. V. Azhayev, M. L. Antopolsky, *Tetrahedron* **2001**, 57, 4977-4986.
- [228] C. Wanninger, H.-A. Wagenknecht, *Synlett* **2006**, 2051-1054.
- [229] M. K. Schlegel, A. E. Peritz, K. Kittigowittana, L. Zhang, E. Meggers, *ChemBioChem* **2007**, 8, 927-932.
- [230] F. Bergstrom, I. Mikhalyov, P. Hagglof, R. Wortmann, T. Ny, L. B. A. Johansson, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, 124, 196-204.
- [231] D. Tleugabulova, Z. Zhang, J. D. Brennan, *J. Phy. Chem. B* **2002**, 106, 13133-13138.
- [232] D. Lachmann, S. Berndl, O. S. Wolfbeis, H. A. Wagenknecht, *Beilstein J. Org. Chem.* **2010**, 6, No. 13.
- [233] K. A. Edwards, A. J. Baeumner, *Anal. Chem.* **2007**, 79, 1806-1815.
- [234] X. Duan, S. Wang, Z. Li, *Chem. Commun.* **2008**, 1302-1304.
- [235] G. L. Lukacs, P. Haggie, O. Seksek, D. Lechardeur, N. Freedman, A. S. Verkman, *J. Biol. Chem.* **2000**, 275, 1625-1629.
- [236] A. O. Crockett, C. T. Wittwer, *Anal. Biochem.* **2001**, 290, 89-97.
- [237] B. P. Wittmershaus, J. J. Skibicki, J. B. McLafferty, Y. Z. Zhang, S. Swan, *J. Fluoresc.* **2001**, 11, 119-128.
- [238] D. Bumcrot, M. Manoharan, V. Koteliensky, D. W. Y. Sah, *Nature Chem. Biol.* **2006**, 2, 711-719.
- [239] D. De Paula, M. V. L. B. Bentley, R. I. Mahato, *RNA* **2007**, 13, 431-456.
- [240] A. M. Jawalekar, M. O. de Beeck, F. L. van Delft, A. Madder, *Chem. Commun.* **2011**, 47, 2796-2798.
- [241] L. Zervas, I. Photaki, N. Ghelis, *J. Am. Chem. Soc.* **1963**, 85, 1337-1341.
- [242] R. Smicius, J. W. Engels, *J. Org. Chem.* **2008**, 73, 4994-5002.
- [243] P. S. Ludwig, R. A. Schwendener, H. Schott, *Synthesis* **2002**, 2387-2392.
- [244] D. A. Barancelli, A. C. Mantovani, C. Jesse, C. W. Nogueira, G. Zeni, *J. Nat. Prod.* **2009**, 72, 857-860.
- [245] N. C. Seeman, *Chem. Biol.* **2003**, 10, 1151-1159.

-
- [246] W. Bannwarth, W. Pfeleiderer, F. Muller, *Helv. Chim. Acta* **1991**, 74, 1991-1999.
- [247] K. V. Gothelf, T. H. LaBean, *Org. Biomol. Chem.* **2005**, 3, 4023-4037.
- [248] S. Katz, *Biochim. Biophys. Acta* **1962**, 68, 240-253.
- [249] G. Clever, C. Kaul, T. Carell, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2007**, 46, 6226-6236.
- [250] H. Weizman, Y. Tor, *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, 123, 3375-3376.
- [251] H. Weizman, Y. Tor, *Chem. Commun.* **2001**, 453-454.
- [252] E. Meggers, P. L. Holland, W. B. Tolman, F. E. Romesberg, P. G. Schultz, *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, 122, 10714-10715.
- [253] S. Atwell, E. Meggers, G. Spraggon, P. G. Schultz, *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, 123, 12364-12367.
- [254] N. Zimmermann, E. Meggers, P. G. Schultz, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, 124, 13684-13685.
- [255] M. Tasaka, K. Tanaka, M. Shiro, M. Shionoya, *Supramol. Chem.* **2001**, 13, 671-675.
- [256] K. Tanaka, M. Tasaka, H. Cao, M. Shionoya, *Supramol. Chem.* **2002**, 14, 255-261.
- [257] K. Tanaka, Y. Yamada, M. Shionoya, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, 124, 8802-8803.
- [258] K. Tanaka, A. Tengeiji, T. Kato, N. Toyama, M. Shionoya, *Science* **2003**, 299, 1212-1213.
- [259] G. H. Clever, S. J. Reitmeier, T. Carell, O. Schiemann, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2010**, 49, 4927-4929.
- [260] K. Tanaka, G. H. Clever, Y. Takezawa, Y. Yamada, C. Kaul, M. Shionoya, T. Carell, *Nature Nanotechnol.* **2006**, 1, 190-194.
- [261] H.-A. Wagenknecht, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2003**, 42, 3204-3206.
- [262] F. C. Simmel, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, 47, 5884-5887.
- [263] E. S. Andersen, M. Dong, M. M. Nielsen, K. Jahn, R. Subramani, W. Mamdouh, M. M. Golas, B. Sander, H. Stark, C. L. P. Oliveira, J. S. Pedersen, V. Birkedal, F. Besenbacher, K. V. Gothelf, J. Kjems, *Nature* **2009**, 459, 73-77.
- [264] C. Mao, W. Sun, Z. Shen, N. C. Seeman, *Nature* **1999**, 397, 144-146.
- [265] S. P. Liao, N. C. Seeman, *Science* **2004**, 306, (5704), 2072-2074.
- [266] K. M. Stewart, L. W. McLaughlin, *Chem. Commun.* **2003**, (23), 2934-2935.

- [267] H. Yang, C. K. McLaughlin, F. A. Aldaye, G. D. Hamblin, A. Z. Rys, I. Rouiller, H. F. Sleiman, *Nature Chem.* **2009**, 1, 390-396.
- [268] S. Ghosh, I. Pignot-Paintrand, P. Dumy, E. Defrancq, *Organic & Biomolecular Chemistry* **2009**, 7, (13), 2729-2737.
- [269] D. Mitra, N. Di Cesare, H. F. Sleiman, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2004**, 43, 5804-5808.
- [270] J. S. Choi, C. W. Kang, K. Jung, J. W. Yang, Y. G. Kim, H. Y. Han, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, 126, (28), 8606-8607.
- [271] K. V. Gothelf, A. Thomsen, M. Nielsen, E. Clo, R. S. Brown, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, 126, 1044-1046.
- [272] K. M. Stewart, L. W. McLaughlin, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, 126, 2050-2057.
- [273] K. M. Stewart, J. Rojo, L. W. McLaughlin, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2004**, 43, (43), 5808-5811.
- [274] L. Zhang, E. Meggers, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, 127, 74-75.
- [275] K. Tanaka, A. Tengeiji, T. Kato, N. Toyama, M. Shiro, M. Shionoya, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, 124, 12494-12498.
- [276] C. Switzer, D. Shin, *Chem. Commun.* **2005**, 1342-1344.
- [277] C. Switzer, S. Sinha, P. H. Kim, B. D. Heuberger, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, 44, 1529-1532.
- [278] D. Shin, C. Switzer, *Chem. Commun.* **2007**, 4401-4403.
- [279] G. H. Clever, K. Polborn, T. Carell, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, 44, 7204-7208.
- [280] L. Zhang, E. Meggers, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, 127, 74-75.
- [281] E. T. Kool, J. C. Morales, K. M. Guckian, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2000**, 39, 990-1009.
- [282] A. A. Henry, F. E. Romesberg, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2003**, 7, 727-733.
- [283] S. Matsuda, F. E. Romesberg, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, 126, 14419-14427.
- [284] C. Brotschi, C. J. Leumann, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2003**, 42, 1655-1658.
- [285] S. A. Benner, K. W. Wellington, *Nucleosides Nucleotides & Nucleic Acids* **2006**, 25, 1309-1333.
- [286] M. Hock, N. Joubert, R. Pohl, B. Klepetarova, *J. Org. Chem.* **2007**, 72, 6797-6805.

-
- [287] M. A. Cameron, S. B. Cush, R. P. Hammer, *J. Org. Chem.* **1997**, 62, 9065-9069.
- [288] M. Hocek, M. Urban, R. Pohl, B. Klepetarova, *J. Org. Chem.* **2006**, 71, 7322-7328.
- [289] F. Babudri, A. Cardone, C. T. Cioffi, G. M. Farinola, F. Naso, R. Ragni, *Synthesis* **2006**, 1325-1332.
- [290] K. Sone, *J. Am. Chem. Soc.* **1953**, 75, 5207-5211.
- [291] K. M. Stewart, L. W. McLaughlin, *Chem. Commun.* **2003**, 39, 2934-2935.
- [292] H. Yang, K. L. Metera, H. F. Sleiman, *Coord. Chem. Rev.* **2010**, 254, 2403-2415.
- [293] M. Göritz, R. Krämer, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, 127, 18016-18017.
- [294] M. Kalek, A. S. Madsen, J. Wengel, *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, 129, (30), 9392-9400.
- [295] L. Kalachova, R. Pohl, M. Hocek, *Synthesis* **2009**, 105-112.
- [296] E. C. Constable, M. D. Ward, *J. Chem. Soc., Dalton Trans.* **1990**, 1405-1409.
- [297] K. T. Potts, D. Konwar, *J. Org. Chem.* **1991**, 56, 4815-4816.
- [298] V. Grosshenny, F. M. Romero, R. Ziessel, *J. Org. Chem.* **1997**, 62, 1491-1500.
- [299] R. H. E. Hudson, A. Ghorbani-Choghamarani, *Synlett* **2007**, 870-873.
- [300] K. Hutchison, J. C. Morris, T. A. Nile, J. L. Walsh, D. W. Thompson, J. D. Petersen, J. R. Schoonover, *Inorg. Chem.* **1999**, 38, 2516-2523.
- [301] P. S. Braterman, J. I. Song, R. D. Peacock, *Inorg. Chem.* **1992**, 31, 555-559.
- [302] J. P. Sauvage, J. P. Collin, J. C. Chambron, S. Guillerez, C. Coudret, V. Balzani, F. Barigelletti, L. Decola, L. Flamigni, *Chem. Rev.* **1994**, 94, 993-1019.
- [303] T. Ohno, S. Kato, S. Kaizaki, I. Hanazaki, *Inorg. Chem.* **1986**, 25, 3853-3858.
- [304] R. Hogg, R. G. Wilkins, *J. Chem. Soc.* **1962**, 341.
- [305] R. H. Holyer, C. D. Hubbard, S. F. A. Kettle, R. G. Wilkins, *Inorg. Chem.* **1966**, 622.
- [306] R. Dobrawa, M. Lysetska, P. Ballester, M. Grune, F. Würthner, *Macromolecules* **2005**, 38, 1315.
- [307] E. T. Kool, *Acc. Chem. Res.* **2002**, 35, 936-943.

- [308] J. Gao, C. Strässler, D. Tahmassebi, E. T. Kool, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 11590-11591.
- [309] K. M. Guckian, B. A. Schweitzer, R. X.-F. Ren, C. J. Sheils, D. C. Tahmassebi, E. T. Kool, *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*, 2213-2222.
- [310] J. Frazer, S. M. Horner, S. A. Woski, *Tetrahedron Lett.* **1998**, *39*, 1279-1282.
- [311] I. A. Prokhorenko, V. A. Korshun, A. A. Petrov, S. V. Gontarev, Y. A. Berlin, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1995**, *5*, 2081-2084.
- [312] U. B. Christensen, E. B. Pedersen, *Nucl. Acid Res.* **2002**, *30*, 4918-4925.
- [313] T. L. Netzel, K. Nafisi, J. Headrick, B. E. Eaton, *J. Phys. Chem.* **1995**, *99*, 17948-17955.
- [314] T. L. Netzel, M. Zhao, K. Nafisi, J. Headrick, M. S. Sigman, B. E. Eaton, *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *117*, 9119-9128.
- [315] N. Amann, H.-A. Wagenknecht, *Synlett* **2002**, 687-691.
- [316] E. Mayer, L. Valis, R. Huber, N. Amann, H.-A. Wagenknecht, *Synthesis* **2003**, 2335-2340.
- [317] H. Suenaga, K. Nakashima, T. Mizuno, M. Takeuchi, I. Hamachi, S. Shinkai, *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1* **1998**, 1263-1267.
- [318] M. Beinhoff, W. Weigel, M. Jurczok, W. Rettig, C. Modrakowski, I. Brüdgam, H. Hartl, A. D. Schlüter, *Eur. J. Org. Chem.* **2001**, 3819-3829.
- [319] P. M. Gannett, T. P. Sura, *Synth. Commun.* **1993**, *23*, 1611-1615.
- [320] M. Ikehara, S. Uesugi, M. Kaneko, 8-Bromoadenosine and its 5'-phosphate. In *Nucleic Acid Chemistry*, Hrsg. L. B. Townsend, R. S. Tipson, John Wiley & Sons: New York, 1978; Vol. 2, pp 837-841.
- [321] M. Ikehara, S. Uesugi, M. Kaneko, *Chem. Commun.* **1967**, 17-18.
- [322] M. Manoharan, K. L. Tivel, M. Zhao, K. Nafisi, T. L. Netzel, *J. Phys. Chem.* **1995**, *99*, 17461-17472.
- [323] C. Wanninger-Weiß, *Dissertation Universität Regensburg* **2008**.
- [324] T. Fiebig, C. Wan, A. H. Zewail, *ChemPhysChem* **2002**, *3*, 781-788.
- [325] S. Steenken, J. P. Telo, H. M. Novais, L. P. Candeias, *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, *114*, 4701-4709.
- [326] A. A. Voityuk, M.-E. Michel-Beyerle, N. Rösch, *Chem. Phys. Lett.* **2001**, *342*, 231-238.
- [327] T. Kubota, K. Kano, T. Konse, *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **1987**, *60*, 3865-3877.

-
- [328] H.-A. Wagenknecht, *Charge Transfer in DNA: From Mechanism to Application*. Wiley-VCH: Weinheim, 2005.
- [329] L. A. Agrofoglio, I. Gillaizeau, Y. Saito, *Chem. Rev.* **2003**, *103*, 1875-1916.
- [330] N. Miyaura, A. Suzuki, *Chem. Rev.* **1995**, *95*, 2457-2483.
- [331] M. Minabe, S. Takeshige, Y. Soeda, T. Kimura, M. Tsubota, *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **1994**, *67*, 172-179.
- [332] P. P. Fu, H. M. Lee, R. G. Harvey, *J. Org. Chem.* **1980**, *45*, 2797-2803.
- [333] H. Lee, R. G. Harvey, *J. Org. Chem.* **1986**, *51*, 2847-2848.
- [334] A. Musa, B. Sridharan, J. Lee, D. L. Mattern, *J. Org. Chem.* **1996**, *61*, 5481-5484.
- [335] T. Ishiyama, Y. Nobuta, J. F. Hartwig, N. Miyaura, *Chem. Commun.* **2003**, 2924-2925.
- [336] T. Ishiyama, J. Takagi, J. F. Hartwig, N. Miyaura, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2002**, *41*, 3056-3058.
- [337] D. N. Coventry, A. S. Batsanov, A. E. Goeta, J. A. K. Howard, T. B. Marder, R. N. Perutz, *Chem. Commun.* **2005**, 2172-2174.
- [338] P. Soustek, M. Michl, N. Almonasy, O. Machahcky, M. Dvorak, A. Lycka, *Dyes and Pigments* **2008**, *78*, 139-147.
- [339] A. G. Giumanini, G. Chiavari, M. M. Musiani, P. Rossi, *Synthesis* **1980**, 743-746.
- [340] V. V. Pavlishchuk, A. W. Addison, *Inorg. Chim. Acta* **2000**, *298*, 97-102.
- [341] A. Trifonov, I. Buchvarov, H.-A. Wagenknecht, T. Fiebig, *Chem. Phys. Lett.* **2005**, *409*, 277-280.
- [342] E. Hayon, *J. Chem. Phys.* **1969**, *51*, 4881-4892.
- [343] M. E. Langmuir, E. Hayon, *J. Chem. Phys.* **1969**, *51*, 4893-4899.
- [344] P. Manoj, H. Mohan, J. P. Mittal, V. M. Manoj, C. T. Aravindakumar, *Chem. Phys.* **2007**, *331*, 351-358.
- [345] W. Li, R. Zheng, Z. Jia, Z. Zou, N. Lin, *Biophys. Chem.* **1997**, *67*, 281-286.
- [346] P. Daublain, A. K. Thazhathveetil, Q. Wang, A. Trifonov, T. Fiebig, F. D. Lewis, *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 16790-16797.
- [347] R. S. Sarpal, S. K. Dogra, *J. Chem. Soc. Faraday Trans.* **1992**, *88*, 2725-2731.
- [348] T. Ehrenschwender, H.-A. Wagenknecht, *J. Org. Chem.* **2011**, *76*, 2301-2304.

- [349] A. Schwögler, L. T. Burgdorf, T. Carell, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2000**, 39, 3918-3920.
- [350] S. Breeger, U. Hennecke, T. Carell, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, 126, 1302-1303.
- [351] T. Stafforst, U. Diederichsen, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, 45, 5376-5380.
- [352] T. Ito, S. E. Rokita, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, 126, 15552-15559.
- [353] T. Ito, A. Hayashi, A. Kondo, T. Uchida, K. Tanabe, H. Yamada, S. Nishimoto, *Org. Lett.* **2009**, 11, 927-930.
- [354] A. Manetto, S. Breeger, C. Chatgililoglu, T. Carell, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, 45, 318-321.
- [355] B. Elias, F. Shao, J. K. Barton, *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, 130, 1152-1153.
- [356] K. Siegmund, P. Daublain, Q. Wang, A. Trifonov, T. Fiebig, F. D. Lewis, *J. Phys. Chem. B* **2009**, 113, 16276-16284.
- [357] P. Daublain, K. Siegmund, M. Hariharan, J. Vura-Weis, M. R. Wasielewski, F. D. Lewis, V. Shafiovich, Q. Wang, M. Raytchev, T. Fiebig, *Photochem. Photobiol. Sci.* **2008**, 7, 1501-1508.
- [358] J. N. Wilson, Y. Cho, S. Tan, A. Cuppoletti, E. T. Kool, *ChemBioChem* **2008**, 9, 279-285.
- [359] S. T. Gaballah, J. D. Vaught, B. E. Eaton, T. L. Netzel, *J. Phys. Chem. B* **2005**, 109, 5927-5934.
- [360] S. T. Gaballah, G. Collier, T. L. Netzel, *J. Phys. Chem. B* **2005**, 109, 12175-12181.
- [361] M. Rist, N. Amann, H.-A. Wagenknecht, *Eur. J. Org. Chem.* **2003**, 2498-2504.
- [362] C. Wanninger-Weiß, L. Valis, J. Barbaric, H.-A. Wagenknecht, *Bioorg. Med. Chem.* **2008**, 16, 100-106.
- [363] N. Amann, E. Pandurski, T. Fiebig, H.-A. Wagenknecht, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2002**, 41, 2978-2980.
- [364] L. Valis, E. Mayer-Enthart, H.-A. Wagenknecht, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2006**, 16, 3184-3187.
- [365] K. Tainaka, M. Fujitsuka, T. Takada, K. Kawai, T. Majima, *J. Phys. Chem. B* **2010**, 114, 14657-14663.
- [366] R. Varghese, H.-A. Wagenknecht, *Chem. Eur. J.* **2009**, 15, 9307-9310.
- [367] R. Varghese, H.-A. Wagenknecht, *Org. Biomol. Chem.* **2010**, 8, 526-528.
- [368] J. Mohanty, H. Pal, A. V. Sapre, *Photochem. Photobiol.* **2003**, 78, 153-158.

-
- [369] M. S. J. Briggs, I. Bruce, J. N. Miller, C. J. Moody, A. C. Simmonds, E. Swann, *J. Chem. Soc.-Perkin Trans. 1* **1997**, (7), 1051-1058.
- [370] R. Varghese, P. K. Gajula, T. K. Chakraborty, H.-A. Wagenknecht, *Synlett* **2009**, 3253-3257.
- [371] J. Y. Han, J. Jose, E. Mei, K. Burgess, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2007**, *46*, 1684-1687.
- [372] M. R. Defelippis, C. P. Murthy, F. Broitman, D. Weinraub, M. Faraggi, M. H. Klapper, *J. Phys. Chem.* **1991**, *95*, 3416-3419.
- [373] H.-A. Wagenknecht, E. D. A. Stemp, J. K. Barton, *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*, 1-7.
- [374] H.-A. Wagenknecht, E. D. A. Stemp, J. K. Barton, *Biochemistry* **2000**, *39*, 5483-5491.
- [375] S. R. Rajski, S. Kumar, R. J. Roberts, J. K. Barton, *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *121*, 5615-5616.
- [376] H.-A. Wagenknecht, S. R. Rajski, M. Pascaly, E. D. A. Stemp, J. K. Barton, *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 4400-4407.
- [377] E. Mayer-Enthart, P. Kaden, H.-A. Wagenknecht, *Biochemistry* **2005**, *44*, 11749-11757.
- [378] J. Barbaric, C. Wanninger-Weiß, H.-A. Wagenknecht, *Eur. J. Org. Chem.* **2009**, 364-370.
- [379] J. Barbaric, *Dissertation Universität Regensburg* **2008**.
- [380] E. Bätzner, *Masterarbeit Universität Regensburg* **2011**.
- [381] X. C. Hong, J. M. Mejia-Oneto, S. France, A. Padwa, *Tetrahedron Lett.* **2006**, *47*, 2409-2412.
- [382] A. J. Blacker, J. Jazwinski, J. M. Lehn, F. X. Wilhelm, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* **1986**, 1035-1037.
- [383] S. Hünig, J. Groß, *Tetrahedron Lett.* **1968**, *9*, (21), 2599-2604.
- [384] A. M. Brun, A. Harriman, *J. Am. Chem. Soc.* **1991**, *113*, 8153-8159.
- [385] H. C. Becker, B. Norden, *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*, (25), 5798-5803.
- [386] H. Ikeda, K. Fuji, K. Tanaka, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1996**, *6*, 101-104.
- [387] H. Ikeda, K. Fuji, K. Tanaka, Y. Iso, F. Yoneda, *Chem. Pharm. Bull.* **1999**, *47*, 1455-1463.
- [388] C. Wellner, *Masterarbeit Universität Regensburg* **2010**.

- [389] H. Sugiyama, I. Saito, *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, 118, 7063-7068.
- [390] K. Tanaka, M. Shionoya, *Chem. Lett.* **2006**, 35, 694-699.
- [391] F. Papadimitrakopoulos, X. M. Zhang, D. L. Thomsen, K. A. Higginson, *Chem. Mater.* **1996**, 8, 1363-1365.
- [392] F. Garay, V. Solis, M. Lovric, *J. Electroanal. Chem.* **1999**, 478, 17-24.
- [393] C. M. G. v. d. Berg, *J. Electroanal. Chem.* **1986**, 215, 111-121.
- [394] Hünig, Kreitmeier, Märkl, Sauer, *Arbeitsmethoden in der organischen Chemie*. 2007.
- [395] W. C. Still, M. Kahn, A. Mitra, *J. Org. Chem* **1978**, 43, 2923-2925.
- [396] H. E. Gottlieb, V. Kotlyar, A. Nudelman, *J. Org. Chem.* **1997**, 62, 7512-7515.
- [397] J. N. Demasa, G. A. Crosby, *J. Phys. Chem* **1971**, 75, 991-1024.
- [398] Prunkl, *Dissertation Universität Regensburg* **2010**.
- [399] J. D. Puglisi, J. Ignacio Tinoco, *Meth. Enzymol.* **1989**, 180, 304-325.